# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Medizinische Klinik und Poliklinik II Hämatologie, Onkologie und Knochenmarktransplantation Hubertus Wald Tumorzentrum Universitäres Cancer Center Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

Gezielte Smoothened-Inhibierung im Hedgehog-Signalweg durch PF-04449913 in der akuten myeloischen Leukämie

# Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Patrizia Seyfert aus Worms

Hamburg 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 02.07.2015.

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

| Prüfungsausschuss, der Vorsitzende : | Prof. Dr. Walter Fiedler   |
|--------------------------------------|----------------------------|
| Prüfungsausschuss, 2. Gutachterin :  | Prof. Dr. Jutta Dierlamm   |
| Prüfungsausschuss, 3. Gutachter :    | Prof. Dr. Martin Horstmann |

# Inhaltsverzeichnis

| 1   | Zielsetzung   | 1          |  |  |
|---|---|------------|--|--|
| 2   | Einleitung  |            |  |  |
|   | 2.1 Leukämie  |            |  |  |
|   | 2.2 Akute myeloische Leukämie (AML)   | 3          |  |  |
|   | 2.2.1 Überblick   | 3          |  |  |
|   | 2.2.2 Ätiopathogenese der AML   | 4          |  |  |
|   | 2.2.3 Therapie der AML  | 5          |  |  |
|   | 2.3 Stammzellen   | 5          |  |  |
|   | 2.3.1 Tumorstammzellen  | 7          |  |  |
|   | 2.3.2 Die Stammzellnische   | . 8        |  |  |
|   | 2.3.3 Die Rolle der Leukämiestammzellen und der Stammzellnische in der  | 10         |  |  |
|   | 2 4 Der Hedgebeg Signalwag  | IU<br>11   |  |  |
|   | 2.4 Del Heugeriog-Signalweekada daa Hadgabag Signalwaga und asina Bastandtaila  |            |  |  |
|   | 2.4.1 Die Signalkaskaue des Hedgehog-Signalwegs und seine Bestandiene.  | 11         |  |  |
|   | 2.4.2 Die Bedeulung des Hedgehog-Signalwegs in der myeleischen Leukämie   | . 14       |  |  |
|   | 2.4.3 Die Kolle des Hedgehog-Signalwegs in der myelolschen Ledkamie   | 15         |  |  |
|   | 2.4.4 Der Heugenog-Signalweg in solden Malighomen   | . 10       |  |  |
| 2   | Material und Methodon   | 10         |  |  |
| ა   | alenal und methoden   | . 10<br>18 |  |  |
|   | 3.1.1 SKM-1   | . 10       |  |  |
|   | 3.1.2 Kasumi-1  | . 10<br>19 |  |  |
|   | 3.1.2 Kasullii-1  | . 10<br>18 |  |  |
|   | 3.2. Der Smoothened-Inhibitor PE-0/1/10013  | 10<br>18   |  |  |
|   | 3.3 Das rekombinante humane Sonic Hedgehog-Protein 1314-SH/CF   | 18         |  |  |
|   | 3.4. Kultivierung der Zelllinien  | 19         |  |  |
|   | 3.5. Bestimmung der Zellzahl  | 19         |  |  |
|   | 3.6 Proliferations-Assavs   | 19         |  |  |
|   | 3.6.1 Vorversuch zur Frmittlung der ontimalen FRS-Konzentration für die   |            |  |  |
|   | Proliferations-Assays   |            |  |  |
| 3.6.2 Proliferation von AML-Zelllinien unter Stimulation mit dem Smooth |   | <u></u> -t |  |  |
|   | Inhibitor PF-04449913   | . 20       |  |  |
| 3.6.3 Langzeitproliferation unter Stimulation mit dem Smoothened-In     |   |            |  |  |
|   | PF-04449913 und dem Hedgehog-Protein Shh  | 20         |  |  |
|   | 3.7 Colony-Assays   | . 21       |  |  |
|   | 3.8 RNA-Isolierung  | . 22       |  |  |
|   | 3.9 cDNA-Synthese   | . 22       |  |  |
|   | 3.10 Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)   | . 22       |  |  |
|   | 3.10.1 Quantitative Real-Time-PCR-Analyse von SKM-1, Kasumi-1 und U937  | 23         |  |  |
|   |   | . 20       |  |  |
| 4   | Ergebnisse  | . 25       |  |  |
|   | 4.1 vorversuch zur Ermittung der optimalen FBS-Konzentration des<br>Mediums für die nachfolgenden Proliferations-Assavs | 25         |  |  |
|   | 4.2 Finfluss des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 auf das  | . 20       |  |  |
|   | Proliferationsverhalten der AML-Zelllinien  | . 26       |  |  |

|   | 4.3 Einfluss des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 und des Hedgehog-<br>Proteins Shh 1314-SH/CF auf die Langzeitproliferation der AML-<br>Zelllinien  | 27   |
|---|---|--|
|   | 4.4 Einfluss des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 und der Effekt des<br>Hedgehog-Proteins Shh 1314-SH/CF auf die Colony-Formations-<br>Kapazität der AML-Zelllinien  | 28   |
|   | 4.5 Einfluss des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 und des Hedgehog-<br>Proteins Shh 1314-SH/CF auf die mRNA-Expression der<br>verschiedenen AML-Zelllinien   | 28   |
|   | 4.5.1 Auswirkungen des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 und des<br>Hedgehog-Proteins Shh 1314-SH/CF auf die mRNA-Expression der<br>Transkriptionsfaktoren Gli1, Gli2 und Gli3  | 29   |
|   | 4.5.2 Auswirkungen des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 und des<br>Hedgehog-Proteins Shh 1314-SH/CF auf die Expression verschiedener<br>Stammzellgene  | 35   |
|   | eta   |  |
| 5   | Diskussion  | 42   |
| 5<br>6                                    | Diskussion<br>Zusammenfassung   | 42<br>51   |
| 5<br>6<br>7                               | Diskussion<br>Zusammenfassung<br>Anhang   | 42<br>51<br>52   |
| 5<br>6<br>7<br>Ta                         | Diskussion<br>Zusammenfassung<br>Anhang<br>abellenanhang  | 42<br>51<br>52<br>52                                     |
| 5<br>6<br>7<br>Ta<br>Ta                   | Diskussion<br>Zusammenfassung<br>Anhang<br>abellenanhang<br>abellenverzeichnis  | 42<br>51<br>52<br>52<br>58                               |
| 5<br>6<br>7<br>Ta<br>Ta                   | Diskussion<br>Zusammenfassung<br>Anhang<br>abellenanhang<br>abellenverzeichnis  | 42<br>51<br>52<br>52<br>58<br>59                         |
| 5<br>6<br>7<br>Ta<br>Al<br>Al             | Diskussion<br>Zusammenfassung<br>Anhang<br>abellenanhang<br>bellenverzeichnis<br>bbildungsverzeichnis   | 42<br>51<br>52<br>52<br>58<br>59<br>60                   |
| 5<br>6<br>7<br>Ta<br>Al<br>Al<br>Li       | Diskussion<br>Zusammenfassung<br>Anhang<br>Tabellenanhang<br>Diskussion<br>Abbildungsverzeichnis<br>Abbildungsverzeichnis<br>Abkürzungsverzeichnis  | 42<br>51<br>52<br>52<br>58<br>59<br>60<br>63             |
| 5<br>6<br>7<br>Ta<br>Al<br>Al<br>Li       | Diskussion<br>Zusammenfassung<br>Anhang<br>Jabellenanhang<br>Jabellenverzeichnis<br>Abbildungsverzeichnis<br>Abkürzungsverzeichnis<br>Jiteraturverzeichnis  | 42<br>51<br>52<br>52<br>58<br>59<br>60<br>63<br>71       |
| 5<br>6<br>7<br>Ta<br>Al<br>Li<br>Da<br>Le | Diskussion<br>Zusammenfassung<br>Anhang<br>Tabellenanhang<br>Diskussion<br>Sabellenanhang<br>Sabellenverzeichnis<br>Sabellenverzeichnis<br>Sabellenverzeichnis<br>Sabellenverzeichnis<br>Sabellenverzeichnis<br>Sabellenverzeichnis<br>Sabellenverzeichnis<br>Sabellenverzeichnis<br>Sabellenverzeichnis<br>Sabellenverzeichnis | 42<br>51<br>52<br>52<br>58<br>59<br>60<br>63<br>71<br>72 |

# 1 Zielsetzung

Der Hedgehog-Signalweg ist essenziell an Zellwachstum und -differenzierung während der Embryogenese beteiligt auch postnatal Stammzellen und Zellen und reguliert mit Vorläufereigenschaften (Stecca und Ruiz i Altaba 2010, Irvine und Copland 2012). So spielt der Hedgehog-Signalweg zudem eine wichtige Rolle in der Hämatopoese (Cridland et al. 2009). Darüber hinaus konnte ein dysregulierter Signalweg in verschiedenen Krebsarten beobachtet werden, welcher konstitutiv aktiviert die Karzinogenese fördert. Auch wurden bereits Zusammenhänge zwischen pathologisch aktiviertem Signalweg und der akuten myeloischen Leukämie (AML) aufgedeckt. So konnte in einem AML-Patientenkollektiv im Vergleich zu Proben gesunder Patienten eine gesteigerte Expression des Hedgehog-Proteins Shh in Knochenmark und Blut beobachtet werden (Su et al.).

Die Standardtherapie der AML zeigt sich in den letzten Jahrzehnten weitgehend unverändert und eignet sich aufgrund ihrer hohen Aggressivität nicht für das gesamte Patientenkollektiv. Dies und die Tatsache, dass die AML noch immer eine relativ schlechte Prognose aufweist, verdeutlichen die Notwendigkeit neue Therapeutika mit zielgerichteter Antitumorwirkung zu entwickeln. Einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt stellen dabei der Hedgehog-Signalweg und sein Rezeptor Smoothened dar.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung des Hedgehog-Signalwegs in der akuten myeloischen Leukämie untersucht werden. In diesem Sinne wurde der Effekt des spezifischen Smoothened-Inhibitors PF-04449913 und des rekombinanten humanen Sonic Hedgehog-Proteins 1314-SH/CF auf die drei verschiedenen AML-Stammzelllinien Kasumi-1, SKM-1 und U937 analysiert. Mittels Proliferations-Assays, Colony-Formations-Assays und quantitativen PCR-Analysen auf die Downstream-Signale Gli1, Gli2 und Gli3 sowie die Stammzellgene LKB1, KLF4, NANOG, POU5F1, PRDM14 und SOX2 wurde die antileukämische Wirkung des Smoothened-Inhibitors untersucht.

# 2 Einleitung

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist die häufigste akute Leukämieform bei Erwachsenen. Sie stellt eine sehr heterogene Erkrankung dar und zeigt eine Vielfalt molekularer Veränderungen als Entstehungsursachen. Diese wurden in den letzten Jahren in Hinsicht auf diagnostische und prognostische Aussagekraft hin untersucht. Weiterführend stellen diese spezifischen Veränderungen auch potenzielle und zielgerichtete Targets für die Behandlung der AML dar. Da sich die Standardtherapie in den letzten Jahren bei nahezu gleichbleibend ungünstiger Prognose nur wenig weiterentwickelt hat, ist die Entwicklung neuer und spezifischer Therapieoptionen von großer Bedeutung. Unter anderem wird auch die Hemmung aktivierter Signalwege in den AML-Zellen als potenzielle Behandlungsmethode untersucht. Das Eingreifen in den Hedgehog-Signalweg könnte einen möglichen neuen Therapieansatz darstellen (Schlenk *et al.* 2013).

# 2.1 Leukämie

Das Krankheitsbild der Leukämie wurde bereits 1845 von dem deutschen Arzt Rudolf Ludwig Karl Virchow beschrieben, als er im Blut erkrankter Patienten eine erhöhte Leukozytenzahl (weiße Blutkörperchen) entdeckte. Nach der griechischen Bedeutung für "weißes Blut" gab er dieser Erkrankung 1847 den Namen Leukämie (Virchow 1856).

Leukämien sind maligne Erkrankungen der hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Durch unkontrollierte Proliferation eines Zellklons und Akkumulation der Leukämiezellen im Knochenmark wird die physiologische Hämatopoese verdrängt, sodass eine Panzytopenie resultiert. Des Weiteren kommt es zur Ausschwemmung maligner und unreifer Zellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut mit möglicher Infiltration extramedullärer Organe (Herold *et al.* 2013). Aus diesen Vorgängen lassen sich die typischen Symptome einer Leukämie ableiten, die sich folgendermaßen einteilen lassen:

1.) Die Symptome der Knochenmarkinsuffizienz

Die gesteigerte Synthese der Leukämiezellen resultiert in einer verringerten Anzahl gesunder Blutzellen.

Als Folge der entstehenden Erythrozytopenie kommt es zu einer Anämie mit Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Blässe, wie auch Belastungsdyspnoe und gesteigerter Herzfrequenz. Die gestörte Granulozytenbildung führt zu einer erhöhten Infektanfälligkeit vor allem in Lunge, Haut, Nasennebenhöhlen und Perianalregion sowie zu Fieber. Durch die ebenfalls verminderte Thrombozytenzahl kann es zu vermehrten Einblutungen in Form von Petechien, Ekchymosen, Epistaxis, Fundus- und Schleimhautblutungen kommen (Löwenberg *et al.* 1999, Herold *et al.* 2013).

## 2.) Die Symptome der Organinfiltration

Die am häufigsten betroffenen Organe sind Milz und Leber mit Spleno- und Hepatomegalie. Des Weiteren kann es zu einer Vergrößerung der Lymphknoten sowie seltener zu einem Befall des zentralen Nervensystems kommen (Löwenberg *et al.* 1999, Herold *et al.* 2013).

Die Einteilung der verschiedenen Leukämieformen erfolgt zum einen nach dem Verlauf in akute und chronische Leukämien. Akute Leukämien zeigen eine rasche Entwicklung und führen unbehandelt

innerhalb weniger Wochen oder Monate zum Tod. Demgegenüber können chronische Leukämien einige Jahre schleichend verlaufen, in denen anfangs häufig kaum Symptome auftreten. Zum anderen werden Leukämien in Hinsicht auf den betroffenen Zelltyp unterschieden. So kann in myeloische und lymphatische Leukämien differenziert werden. Die vier wichtigsten Formen setzen sich aus diesen Merkmalen zusammen: Akute lymphatische Leukämie, akute myeloische Leukämie, chronische lymphatische Leukämie und chronische myeloische Leukämie (Guillerman *et al.* 2011, Herold *et al.* 2013). Die Diagnosekriterien und die Therapieentscheidungen variieren je nach Leukämietyp.

Im Weiteren werden diese lediglich für die AML aufgeführt.

## 2.2 Akute myeloische Leukämie (AML)

# 2.2.1 Überblick

Bei Erwachsenen stellen etwa 80% der akuten Leukämien myeloische Leukämien dar, weshalb dieser Form eine bedeutende Rolle im adulten Alter zukommt (Herold 2013). Der Altersgipfel der AML liegt im 67. Lebensjahr (O'Donnell *et al.* 2012). Das amerikanische Krebsregister *Surveillance Epidemiology and End Results (SEER)* ermittelte für das Jahr 2011 eine altersadaptierte Inzidenz von 3,51/100.000 Einwohner/Jahr (Howlader *et al.* 2014).

Da akute Leukämien einen raschen Verlauf zeigen, treten oben genannte Symptome bei der AML nur wenige Wochen vor Diagnosestellung auf. Die Sicherung der Diagnose erfolgt mittels Differentialblutbild und durch einen Knochenmarkausstrich (Herold 2013).

Die Klassifikation der AML kann zum einen durch die *French-American-British-Group (FAB-Klassifikation)* erfolgen, bei der die Erkrankung nach zytomorphologischen Aspekten in acht Subtypen (M0-M7) unterteilt wird. Diese wird jedoch zunehmend durch die Klassifikation der *World Health Organization (WHO)* ersetzt, die unter anderem auch das Auftreten von genetischen Aberrationen berücksichtigt. Die WHO-Klassifikation wird in Tabelle 1 ausführlich aufgeführt (Vardiman *et al.* 2009). Während die FAB für die Diagnose einer AML einen Blastenanteil von >30% im Knochenmark voraussetzt, ist nach WHO-Einteilung ein Blastenanteil von bereits >20% ausreichend. (Estey und Döhner 2006, O'Donnell *et al.* 2012).

#### Acute myeloid leukemia and related neoplasms

#### Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities

AML with t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1* AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11* APL with t(15;17)(q22;q12); *PML-RARA* AML with t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL* AML with t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214* AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVI1* AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1 Provisional entity: AML with mutated NPM1 Provisional entity: AML with mutated CEBPA* 

#### Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes

### Therapy-related myeloid neoplasms

### Acute myeloid leukemia, not otherwise specified

AML with minimal differentiation AML without maturation AML with maturation Acute myelomonocytic leukemia Acute monoblastic/monocytic leukemia Acute erythroid leukemia Pure erythroid leukemia Erythroleukemia, erythroid/myeloid Acute megakaryoblastic leukemia Acute basophilic leukemia Acute panmyelosis with myelofibrosis

## Myeloid sarcoma

### Myeloid proliferations related to Down syndrome

Transient abnormal myelopoiesis Myeloid leukemia associated with Down syndrome

### Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm

#### Acute leukemias of ambiguous lineage

Acute undifferentiated leukemia Mixed phenotype acute leukemia with t(9;22)(q34;q11.2); *BCR-ABL1* Mixed phenotype acute leukemia with t(v;11q23); *MLL* rearranged Mixed phenotype acute leukemia, B-myeloid, NOS Mixed phenotype acute leukemia, T-myeloid, NOS *Provisional entity: natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma* 

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML (2008) entnommen aus (Vardiman et al. 2009)

# 2.2.2 Ätiopathogenese der AML

Obwohl die Ätiologie der AML weitgehend unbekannt ist, wurden bereits einige mögliche Ursachen identifiziert. Als ein induzierender Faktor gilt beispielsweise das Benzol (McHale *et al.* 2012). Weiter zeigen Patienten mit angeborenen Erkrankungen, wie dem Down-Syndrom oder dem Klinefelter-Syndrom eine erhöhte Erkrankungsinzidenz (Schaich 2007, Buske *et al.* 2010). Die sogenannte therapieassoziierte AML kann sich nach Behandlung mit verschiedenen Chemotherapeutika, vor allem bei Therapie mit Alkylanzien und Topoisomerase-Hemmern, oder nach erfolgter Bestrahlung entwickeln. Eine weitere Sonderform ist die sekundäre AML, die aus einer anderen Erkrankung, wie zum Beispiel dem myelodysplastischen Syndrom hervorgehen kann (Buske *et al.* 2010).

Die AML kann genetisch in zwei Gruppen unterteilt werden: Die AML mit einem unauffälligem und die AML mit einem aberranten Karyotyp. Letztere wird weiter unterteilt in unbalancierte und balancierte Mutationen. Den Hauptteil macht mit 45% die AML mit einem unauffälligen Karyotyp aus (Buske *et al.* 2010). Hier spielen vor allem Mutationen in den Genen Nucleophosmin (NPM1), CCAAT/Enhancer-Binding-Protein-Alpha (CEBPA) und Fms-like-tyrosine-kinase-3-Gen (FLT3) eine wichtige Rolle, da diese bereits in der Klinik bei Diagnostik, Therapie und hinsichtlich der Prognose Berücksichtigung finden (Schlenk *et al.* 2013). Von diesen 45% weist das NPM1-Gen mit mehr als 48% die häufigste

Mutationsrate auf. Es folgen die aktivierende FLT3-Mutation mit 29-48% und das CEBPA, welches in 4-15% im Sinne einer Loss-of-Function-Mutation verändert ist (Buske *et al.* 2010). Isolierte NPM1- und CEBPA-Mutationen mit normalen Karyotyp stehen für eine günstige Prognose der Erkrankung. Im FLT3-Gen unterscheidet man die interne Tandemduplikation FLT3-ITD und eine seltenere Punktmutation in der Tyrosinkinasedomäne, die beide zu einer konstitutiven Aktivierung der Tyrosinkinase und so zu einer gesteigerter Proliferation und einer verringerter Apoptose der Leukämiezellen führen. Somit stellt diese Mutation einen prognostisch ungünstigen Marker dar. Tritt sie in Kombination mit einer NPM1-Mutation auf, so ist die Prognose ebenfalls ungünstig, obgleich sich eine alleinige NPM1-Mutation prognostisch günstig auswirken würde (Pabst *et al.* 2001, Kiyoi und Naoe 2002, Brunangelo *et al.* 2005, Buske *et al.* 2010).

#### 2.2.3 Therapie der AML

Patienten, welche an einer AML erkrankt sind, sollten zur Betreuung und Therapie an ein hämatologisch-onkologisches Zentrum überwiesen werden. Nach den Leitlinien wird die Therapie der AML in zwei Phasen eingeteilt, in die Induktionstherapie und in die Postremissionstherapie. Unter Induktionstherapie versteht man das Erreichen einer kompletten Remission. Diese ist dadurch charakterisiert, dass weniger als 5% Blasten im Knochenmark nachweisbar sind und sich das periphere Blutbild unauffällig darstellt (Cheson 2003, Hellenbrecht 2008). Die Grundzüge der Induktionstherapie sind seit mehreren Jahrzehnten weitgehend unverändert. Es handelt sich hierbei um eine Kombination aus den Chemotherapeutika Daunorubicin (DNR) und Cytarabin (AraC) (Derolf et al. 2009, Buske et al. 2010). Der Therapieplan sieht ein "3+7-Schema" vor, bei dem das Anthrazyklin Daunorubicin in einer Dosierung von 40-60 mg/m² an Tag 3-5 und das Cytarabin mit einer Dosis von 100-200 mg/m²/d kontinuierlich für eine Woche verabreicht wird (Löwenberg *et al.* 1999, Buske et al. 2010, Büchner et al. 2013). Nach Erreichen einer kompletten Remission schließt sich die sogenannte Postremissionstherapie, beziehungsweise Konsolidierungstherapie an. Diese besteht entweder aus einer Hochdosischemotherapie, zum Beispiel mit hochdosiertem AraC, oder einer allogenen Stammzelltransplantation. Die Therapieentscheidung wird abhängig von der Verfügbarkeit eines Spenders, dem Allgemeinzustand und dem Alter des Patienten sowie weiteren Risikofaktoren getroffen (Büchner et al. 2013). Die Prognose der AML ist leider bis heute nicht besonders gut. So ergibt sich eine 5-Jahresüberlebensrate von 33% bei Patienten <60 Jahren und von 12% bei Patienten >60 Jahren (Büchner et al. 2006). Vor diesem Hintergrund ist eine weiterführende Erforschung von neuen Behandlungsstrategien und -ansätzen von großer Bedeutung. Besondere Berücksichtigung sollten hier Therapieoptionen finden, die sich auf die Zerstörung der durch sogenannten Leukämiestammzellen konzentrieren, da diese eine verstärkte Chemotherapieresistenz maßgeblich an der schlechten Prognose und Heilungsrate der AML beteiligt sind.

#### 2.3 Stammzellen

Stammzellen sind Zellen, die sich durch eine Selbsterneuerungsfunktion und die Eigenschaft zur Weiterdifferenzierung in unterschiedliche Zelltypen auszeichnen. Hierzu verfügen sie über die Möglichkeit einer asymmetrischen Zellteilung. Dabei entsteht einerseits eine weitere Stammzelle, welche identisch zur Mutterzelle ist, und andererseits eine differenzierte Tochterzelle. Bei ihrer

symmetrischen Zellteilung entstehen zwei gleiche Zellen und somit entweder zwei identische Stammzellen oder zwei identische differenzierte Tochterzellen. Durch diese spezielle Fähigkeit kann die Persistenz der Stammzellen gesichert werden und dennoch können entsprechend differenzierte Zellen als Nachschub für verschiedene Gewebe zur Verfügung gestellt werden (Lagasse *et al.* 2001, Denham *et al.* 2005, Adams und Scadden 2006).

Eine Unterteilung der Stammzellen erfolgt in embryonale und adulte Stammzellen. Embryonale Stammzellen sind bis zum sogenannten Morulastadium totipotent, sodass sie die Fähigkeit besitzen einen eigenen Organismus zu bilden. Mit Erreichen des Blastozystenstadiums weisen embryonale Stammzellen jedoch nur noch pluripotente Charakteristika auf. Aus ihnen kann dementsprechend kein eigener Organismus mehr entstehen. Allerdings können sich aus ihnen Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Entoderm, Mesoderm) sowie der Keimbahn entwickeln. Adulte Stammzellen hingegen besitzen ausschließlich noch die Eigenschaft sich in verschiedene Zelltypen eines bestimmten Gewebes zu differenzieren (Denham *et al.* 2005).

Insbesondere für die hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) bestehen sehr gute Kenntnisse (Blau *et al.* 2001). Diese sind essenziell zur Erneuerung und Versorgung des Blut- und des Immunsystems und dienen der Aufrechterhaltung der Hämatopoese. Die Hämatopoese besitzt eine streng hierarchische Struktur, in der die Stammzellen die Spitze bilden. Eine schematische Übersicht ist in Abbildung 1 dargestellt. Die HSCs werden weiter unterteilt in long-term HSCs (LT-HSCs), short-term HSCs (ST-HSCs) und multipotente Vorläuferzellen. Während LT-HSCs eine ausgeprägte Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, ist diese bei den ST-HSCs bereits verringert und bei den multipotenten Progenitorzellen nicht mehr nachweisbar. Gegensätzlich dazu verhält sich die Proliferationstendenz, welche bei den Progenitorzellen am höchsten und bei den LT-HSCs am geringsten ausgeprägt ist (Tannishtha *et al.* 2001, Yip und So 2013). Aus den multipotenten Vorläuferzellen hervorgehend folgen die gemeinsamen Vorläuferzellen der myeloiden und der lymphatischen Zellreihe, die sich über mehrere Stufen zu reifen Blutzellen ausdifferenzieren.



#### Abbildung 1: Der hierarchische Aufbau der Hämatopoese (Denham 2005)

An der Spitze der streng hierarchischen Struktur stehen die sogenannten "long-term"-Stammzellen (LT-HSCs), welche eine ausgeprägte Selbsterneuerungsfähigkeit besitzen. Ihnen folgen die "short-term" Stammzellen (ST-HSCs), welche eine geringfügigere Selbsterneuerungstendenz aufweisen. Aus diesen gehen wiederum die multipotenten Vorläuferzellen (MPP) hervor. Diese besitzen kein Selbsterneuerungspotential. Hiernach spaltet sich die Hämatopoese durch die Bildung von myeloiden (CMP) und lymphoiden Vorläuferzellen (CLP) in zwei Zweige auf. Zum einen in die Myelopoese, bei der einerseits aus den megakaryozytär-erythroiden Vorläuferzellen (MEP) Erythrozyten und Thrombozyten entstehen und andererseits aus den granulozytär-monozytären Vorläuferzellen (GMP) Granulozyten und Makrophagen. Zum anderen spaltet sich die Blutbildung in den Zweig der Lymphopoese auf. Hier entstehen aus den lymphoiden Vorläuferzellen (CLP) natürliche Killerzellen (NK cells) sowie T- und B-Zellen. Sowohl aus der Myelopoese, als auch aus der Lymphopoese gehen dendritische Zellen (dendritic cells) hervor.

## 2.3.1 Tumorstammzellen

Die Krebsforschung der letzten Jahre hat sich zunehmend mit der Entstehung und den Eigenschaften von Tumoren beschäftigt. Von großer Bedeutung ist die sogenannte Tumorstammzellhypothese, die in Tumoren, ebenso wie bei der Hämatopoese, einen hierarchischen Aufbau vermutet. An der Spitze dieser Hierarchie stehen die sogenannten Tumorstammzellen. Diese stellen einen speziellen Zelltyp dar, der nur einen kleinen Anteil an der gesamten Malignommasse ausmacht. Sie besitzen jedoch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Generierung differenzierter Krebszellen. Dementsprechend verfügen diese Tumorzellen über Stammzelleigenschaften (Tannishtha *et al.* 2001, Sales *et al.* 2007). In Leukämien werden Tumorstammzellen als leukämische Stammzellen (LSCs) bezeichnet. Gerade für die AML sind viele Kenntnisse über die Existenz von LSCs vorhanden. Bonnet *et al.* konnten bereits 1997 Krebsstammzellen in der AML identifizieren. Es gelang ihnen durch Transplantation von CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>-LSCs eine AML in immunsupprimierten Mäusen zu induzieren. Im Gegensatz dazu konnte trotz 100fach erhöhter Konzentration weder durch Transplantation von CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>-Zellen eine Leukämie hervorgerufen werden (Bonnet und Dick 1997). CD34 ist ein charakteristisches Oberflächenmerkmal hämatopoetischer Stammzellen. Da im oben genannten

werden konnte, lässt sich vermuten, dass die LSCs direkt aus den HSCs hervorgehen. Eine weitere Theorie zur Entstehung der LSCs beruht auf der Vermutung, dass diese sich nicht direkt aus den primitiven HSCs, sondern aus differenzierteren Vorläuferzellen entwickeln und durch Mutation die Fähigkeit zur Selbsterneuerung wieder erlangen können (Krivtsov *et al.* 2006, Zhao *et al.* 2010).

Die Tumorstammzellhypothese bietet verschiedene Ansätze zur Erklärung für das Entstehen von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika und für das häufige Auftreten von Rezidiven. Tumorstammzellen zeichnen sich, ebenso wie physiologische Stammzellen, gegenüber einfachen Krebszellen unter anderem durch eine geringere Proliferationstendenz aus. Sie befinden sich gehäuft in einem ruhenden Zustand und in einer geschützter Umgebung, der sogenannten Stammzellnische. So wird erreicht, dass Stammzellen von äußeren Einflüssen weitestgehend abgeschirmt werden und sich folglich mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapien und Bestrahlungen präsentieren können. Aktuelle Therapieverfahren können die Tumorstammzellen möglicherweise gar nicht erfassen. Diese Kenntnisse ergeben neue Ansätze zur spezifischen Tumortherapie (Magee *et al.* 2012).

#### 2.3.2 Die Stammzellnische

Als Stammzellnische wird eine Einheit aus einer bestimmten Lokalisation und einer entsprechenden Mikroumgebung bezeichnet. Diese Mikroumgebung wird aus spezifischen unterstützenden Zellen und extrinsischen Faktoren gebildet. Die Stammzellnische bietet den Stammzellen einen Schutz vor äußeren Einflüssen und damit eine Kontrolle über Apoptose, Proliferation und Differenzierung und ist somit für den Erhalt der Stammzellpopulation von enormer Bedeutung (Moore und Lemischka 2006, Scadden 2006). Verschiedene Stammzellarten haben ihre Nischen in unterschiedlichen Geweben des Körpers und sind folglich wiederum abhängig von verschiedenen Mikroumgebungen. Bei hämatopoetischen Stammzellen werden zwei verschiedene Nischenarten vermutet. Zum einen eine ossäre und zum anderen eine vaskuläre Nische (Bianco 2011).

Durch verschiedene Forschungsgruppen konnte gezeigt werden, dass die Stammzellnische für die HSCs in den trabekulären Strukturen des Knochens lokalisiert ist und in enger Verbindung zu den Osteoblasten des Knochenmarks steht. Bereits 1975 und 1978 konnten Lord *et al.* und Gong beobachten, dass endostales Knochenmark deutlich höhere Konzentrationen an hämatopoetischen Stammzellen aufweist als das zentrale Knochenmark. Diese Ergebnisse lassen auf eine bevorzugte Beteiligung des endostalen Knochenmarks an der Bildung einer hämatopoetischen Stammzellnische schließen (Lord *et al.* 1975, Gong 1978). Weiter wurde herausgefunden, dass sich transplantierte HSCs nach vorheriger Myeloablation bevorzugt endostal ansiedeln (Zhang und Li 2008). Calvi *et al.* beobachteten wiederum, dass die Anzahl der HSCs *in vivo* durch Parathormon (PTH) und durch Parathormon-related-Peptid (PTHrP)-stimulierte Osteoblasten gesteigert werden konnte. Dies spricht ebenfalls für eine Beteiligung der Osteoblasten in der Stammzellregulierung und somit auch für ihre Bedeutung in der Formation der ossären Nische (Calvi *et al.* 2003). Die beschriebene Relation zwischen erhöhten Osteoblast-Zahlen und daraus folgend erhöhten HSC-Konzentrationen im Knochenmark konnten Zhang *et al.* bekräftigen (Zhang *et al.* 2003). Allerdings konnte eine Beeinflussung der Stammzellrate nicht für alle Osteoblasten nachgewiesen werden, jedoch für

Osteoblasten welche das Adhäsionsprotein N-Cadherin exprimieren (Zhang *et al.* 2003, Li und Xie 2005).

Eine weitere These zur Lokalisation der hämatopoetischen Stammzellnische ist die Existenz einer vaskulären Nische (Zhang und Li 2008). Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass neben der Blutbildung im Knochenmark die Möglichkeit der extramedullären Blutbildung besteht. Weder in Leber, noch in Milz, den hauptsächlichen Orten der extramedullären Hämatopoese, kommen Osteoblasten vor, sodass diese keine zwingende Voraussetzung zur Ausbildung einer Stammzellnische darstellen können. Kiel *et al.* konnten aufzeigen, dass sich viele HSCs neben der Lokalisation im Knochenmark auch extramedullär an sinusoidalen Endothelzellen organisieren (Kiel *et al.* 2005). Auch die Eigenschaft der Stammzellen bei Bedarf innerhalb kürzester Zeit in den Organismus ausschwemmen zu können, lässt auf einen engen Kontakt zu Blutgefäßen schließen. Dies wiederum stützt die Hypothese, dass nicht nur eine einzige Nischenform existiert (Kiel *et al.* 2005, Doan und Chute 2012). Es bestehen allerdings kontroverse Daten über eine reine Koexistenz oder eine Verbindung beider Nischenformen. So wurde weiter beobachtet, dass sich HSCs im Ruhezustand von der ossären Nische lösen und zur vaskulären Nische gelangen können um dort zu differenzieren und in die Blutstrombahn zu gelangen (Heissig *et al.* 2002, Kopp *et al.* 2005, Zhang und Li 2008). Eine graphische Veranschaulichung der hämatopoetischen Stammzellnische ist in Abbildung 2 dargestellt.



#### Abbildung 2: Die hämatopoetische Stammzellnische (modifiziert nach Li und Xie 2005)

Die Stammzellnische befindet sich vor allem im Bereich des endostalen Knochenmarks. Ein Komplex aus N-cadherin-positiven Osteoblasten (SNO) sowie mehreren Wachstumsfaktoren und Zytokinen bildet eine Verbindung zwischen hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) und anderen Nischenzellen. Hierdurch wird der Verbleib der Stammzellen in der geschützten Nische unterstützt. Verschiedene Stromazellen (stromal cells) beeinflussen die Zellaktivierung, den Zellwachstum und die Differenzierung der Stammzellen durch Sekretion verschiedener Signalmoleküle. Die gereifte Zellen (mature cells) wandern in die Blutgefäße und gelangen so in den Blutkreislauf.

# 2.3.3 Die Rolle der Leukämiestammzellen und der Stammzellnische in der Behandlung der Leukämie

Es bestehen verschieden Ansätze zur Erklärung der hohen Rezidivrate sowie der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika in der AML. Eine wichtige Ursache hierfür bildet das Vorkommen von Tumorstammzellen, deren Bedeutung vor allem für die AML nachgewiesen ist. Ishikawa et al. konnten leukämische Stammzellen in nonobese diabetic/severe zeigen, dass sich combined immunodeficient/interleukin (NOD/SCID/IL) 2ry<sup>null</sup>-Mäusen gehäuft in der ossären Nische finden. Dort werden sie von Zytostatika abgeschirmt und können somit eine Resistenz gegenüber der Chemotherapiewirkung entwickeln (Ishikawa et al. 2007). Weitere Untersuchungen in NOD/SCID/IL2ry<sup>null</sup>-Mäusen mit humanen AML-Zellen ergaben, dass diese sich innerhalb der Nische vorwiegend in der Go-Phase des Zellzyklus befinden (Saito et al. 2010b). Die Go-Phase stellt eine Ruhephase dar, in der Zellen weiterer Proliferation entgehen. Exogene Stimuli können einen Wiedereintritt der Zellen aus der Go-Phase in den Zellzyklus bewirken (Gillett und Barnes 1998). Durch Stimulation mit Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) konnten Saito et al. dieses erneute Eintreten von LSCs in den Zellzyklus provozieren. Bei simultaner Anwendung des Chemotherapeutikums AraC wurde außerdem ein verbessertes Ansprechen im Sinne einer erhöhten Apoptoserate der LSCs in vivo sowie ein verbessertes Überleben von sekundär transplantierten Mäusen beobachtet (Saito et al. 2010b). In Bezug auf oben zitierte Versuchsergebnisse lässt sich sagen, dass ein Überführen der LSCs aus dem G₀-Zustand in den Zellzyklus zu einem verbesserten Ansprechen auf das Zytostatikum führte.

Um AML-LSCs zielgerichtet zu vernichten, bieten spezielle Oberflächenmoleküle der Zellen weitere Angriffspunkte. Die Oberflächenmerkmale CD25 und CD32 könnten hierfür geeignete Ziele darstellen. Im Rahmen einer Studie mit 61 AML-Patienten konnten in 53% der Fälle CD25 und beziehungsweise oder CD32 auf LSCs detektiert werden. Da sie zwar gehäuft auf LSCs und lediglich selten auf physiologischen HSCs nachgewiesen wurden, stellen sie ein vielversprechendes Therapietarget dar. Diese spezifische Verteilung impliziert, dass die physiologische Hämatopoese durch entsprechend zielgerichtete Therapien weitgehend verschont bleiben würde. Des Weiteren konnte CD25 und CD32 auch auf den LSCs nachgewiesen werden, welche sich im Schutz der Stammzellnische befanden und die hierdurch von herkömmlichen Therapien abgeschirmt werden. Auch nach erfolgter zytostatischer Behandlung waren die Oberflächenmerkmale weiterhin auf den verbliebenen LSCs nachweisbar (Saito *et al.* 2010a).

In einer Studie mit NOD/SCID-Mäusen wurde die Wirkung des monoklonalen anti-CD123 Antikörpers 7G3 getestet. 7G3 ist ein gegen die α-Kette des Interleukin-3-(IL-3)-Rezeptors gerichteter Antikörper und wirkt somit antagonistisch zu IL-3. Die Behandlung mit 7G3 führte zu einem reduzierten Engraftment, einer verringerter Proliferation der LSCs und einer verbesserten Überlebensrate der Mäuse. Zusätzlich erfolgte eine Aktivierung des Immunsystems. Bei Mäusen mit vorbestehender AML verringerte 7G3 zudem den Befall im Knochenmark und Blutkreislauf. *In vitro* konnte eine Verschlechterung von Überleben und Vermehrung in CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-LSCs beobachtet werden. Im Gegensatz zu AML-Stammzellen sind HSCs in ihrer Funktion im Wesentlichen unabhängig von IL-3, sodass diese bei gezielter Behandlung durch 7G3 vorzugsweise ungestört bleiben. Von Bedeutung ist weiterhin, dass der Nachweis von CD123 als negativ prognostischer Marker gilt, sodass ein selektiver 10

Hemmstoff in dieser Hinsicht einen großen prognostischen Vorteil bringen könnte (Jin *et al.* 2009, Naujokat 2012).

## 2.4 Der Hedgehog-Signalweg

Der Hedgehog-Signalweg ist ein Signaltransduktionsweg, der vor allem bei Zellwachstum und Differenzierung in der Embryogenese der Säugetiere eine Rolle spielt. So kann eine Störung des Signalwegs während der Embryogenese zu angeborenen Fehlbildungen wie einer Polydaktylie (Vielfingrigkeit) oder einer Holoprosencephalie (HPE) führen. Bei letztgenannter kommt es während der Hirnentwicklung zu einer unvollständigen Teilung des Vorderhirns (Muenke und Beachy 2000, Hill *et al.* 2003). Eine pathologische Aktivierung des Signalwegs wurde zudem bei verschiedenen Krebserkrankungen nachgewiesen auf welche in einem späteren Unterkapitel noch genauer eingegangen wird. Das Gen Hedgehog, nach dem der Signalweg benannt wurde, wurde 1980 durch Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschhaus bei einer Forschungsarbeit über die Embryonalentwicklung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980). 1995 erhielten sie dafür zusammen mit Edward B. Lewis den "Nobelpreis für Physiologie oder Medizin".

## 2.4.1 Die Signalkaskade des Hedgehog-Signalwegs und seine Bestandteile

Als Signalmoleküle des Hedgehog-Signalwegs in Vertebraten sind drei verschiedene homologe Proteine bekannt. Diese werden als Desert Hedgehog (Dhh), Indian Hedgehog (Ihh) und Sonic Hedgehog (Shh) bezeichnet und weisen untereinander eine sehr große Ähnlichkeit auf (Echelard et al. 1993, Riobo und Manning 2007). Sie finden sich teilweise spezifisch in bestimmten Organen, beziehungsweise Zellen. So wird Dhh in den Hoden exprimiert und ist in der Hodenentwicklung und in verschiedenen Stadien der Spermatogenese von Bedeutung (Bitgood et al. 1996, Makela et al. 2011, O'Hara et al. 2011). Auch wurde sein Vorkommen im peripheren Nervensystem, genauer in den Schwannzellen, nachgewiesen, wo es eine Rolle in der Myelinisierung zu haben scheint (O'Hara et al. 2011, Yoshimura und Takeda 2012). Ihh hingegen kommt vor allem in den Chondrozyten vor und ist an der Regulierung ihrer Proliferation sowie an der Osteoblastentwicklung und somit an der enchondralen Skelettbildung beteiligt (St-Jacques et al. 1999, Karp et al. 2000). In einer Vielzahl von Prozessen wiederum ist Shh von Bedeutung, welches bis heute auch das am besten untersuchteste Hedgehog-Protein darstellt. Bellusci et al. konnten zeigen, dass Shh während der Lungenentwicklung relevant ist (Bellusci et al. 1997). Des Weiteren spielt es eine Rolle in der frühen Zahnentwicklung (Hardcastle et al. 1998), der Morphogenese der Haarfollikel (St-Jacques et al. 1998) und bei der Ausbildung des Neuralrohrs (Marigo und Tabin 1996).

Trotz verschiedener Expressions- und Wirkungsorte durchlaufen die drei Hedgehog-Proteine bestimmte sehr ähnliche posttranslationale Veränderungen, bevor sie den Signalweg als Liganden aktivieren können. Diese werden im Folgenden am Beispiel von Shh erläutert. Shh wird als ein 45 kDa schweres Vorläuferprotein synthetisiert. Durch eine autokatalytische Reaktion wird dieses in einen 25 kDa großen C-terminalen Teil (katalytische Domäne) und ein etwa 19 kDa großes N-terminales Signalmolekül (Shh-N, im Folgenden als Shh bezeichnet) gespalten. Das als Cofaktor der autokatalytischen Spaltung wirkende Cholesterol bindet kovalent an das C-terminale Ende des

Signalmoleküls (Porter *et al.* 1996, Mann und Beachy 2004, Buglino und Resh 2010, Briscoe und Thérond 2013). Schließlich wird der N-Terminus von Shh durch die Hedgehog-Acyltransferase Skinny mit Palmitat modifiziert (Chamoun 2001, Mann und Beachy 2004, Buglino und Resh 2010).

Die Abgabe von Shh aus der Signalzelle in den extrazellulären Raum erfolgt durch Dispatched (Disp). einem 12-Transmembranprotein (Etheridge et al. 2009, Callejo et al. 2011). Als Hedgehog-Rezeptor fungiert Patched (Ptch), von dem in Vertebraten zwei Homologe existieren. Ptch-1, welches eine wichtige Rolle in der Embryogenese spielt und ein Tumorsupressorgen darstellt, und Ptch-2, ein strukturelles Homolog zu Ptch-1 (Li et al. 2011). Ptch ist ebenso wie Disp ein 12-Transmebranproteinrezeptor, welcher in Abwesenheit des Hedgehog-Liganden das 7-Transmembranprotein Smoothened (Smo) inhibiert. Smo ähnelt in vielen seiner Eigenschaften den G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren (GPCRs). Neben einer heptahelikalen Transmembrandomäne weist Smo ein cysteinreiches extrazelluläres N-Terminum und ein intrazellulär lokalisiertes C-terminales Peptid auf. Die Transmembrandomäne dient einigen identifizierten Liganden als Bindungsstelle. So zum Beispiel dem Alkaloid Cyclopamin, welches als Smo-Antagonist wirkt (Ayers und Thérond 2010). Charakteristisch für die GPCRs ist weiterhin eine, durch Aktivierung ausgelöste, Dimerisierung und Phosphorylierung. Dieser Vorgänge lassen sich ebenfalls bei der Aktivierung von Smo finden (Ayers und Thérond 2010).

Zu einer Aktivierung der Signalkaskade kommt es durch Bindung des Hedgehog-Proteins (Hh) an den Rezeptor Ptch. Infolgedessen wird die Hemmung von Ptch auf Smo aufgehoben und das Signal kann in die Zelle weiter geleitet werden. Über mehrere Schritte kommt es zur Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern und zur daraus resultierenden Transkription der Zielgene. Hierunter befindet sich unter anderem das Gen für Ptch, welches dann im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus auf den Hedgehog-Signalweg einwirken kann. Hauptsächlich jedoch werden die Transkriptionsfaktoren Gli1-3 (Gliom assoziiertes Onkogen1-3) reguliert. Diese gehören zu der Familie der Zinkfingerproteine. Gli2 und Gli3 wirken in ihrer vollen Länge als Aktivatoren der Transkription, können jedoch nach Prozessierung mit Entfernung der C-terminalen Aktivatordomäne als Repressoren fungieren. Gli2 wirkt vorwiegend als Aktivator und Gli3 vor allem als Repressor. Im Gegensatz zu diesen fehlt bei Gli1 die N-terminale Repressordomäne, weshalb Gli1 ausschließlich als Aktivator agiert (Rubin und Sauvage 2006, Ingham *et al.* 2011, Briscoe und Thérond 2013).

Eine zentrale Rolle in der Hedgehog-Signalkaskade in Vertebraten stellt das primäre Zilium dar. Zilien sind Microtubuli-gebundene Organellen, welche in den meisten eukaryotischen Zellen vorhanden sind und sowohl für den inaktiven als auch für den aktiven Zustand des Hedgehog-Signalwegs von Bedeutung sind (Briscoe und Thérond 2013). In Abwesenheit des Hedgehog-Proteins befindet sich der Rezeptor Ptch im primären Zilium. Dagegen konnten weder Smo noch die Gli-Proteine im inaktiven Zustand im Zilium nachgewiesen werden. Einen hemmenden Einfluss downstream von Smoothened übt das Kinesin-ähnliche Protein Kif7 aus, welches am Basalkörper des Ziliums lokalisiert ist (Liem *et al.* 2009). Es bildet eine Gerüststruktur für die Proteinkinase A (PKA), die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) und die Casein Kinase 1 (CK1), welche über Phosphorylierungen den proteasomalen Umbau der Gli-Proteine in ihre Repressorform Gli<sub>R</sub> initiieren (Liem *et al.* 2009). Ebenso wie Kif7 fungiert das cytoplasmatische Protein Supressor of Fused (SuFu)

als negativer Regulator. Es bildet gemeinsam mit den Gli-Proteinen einen Komplex und verhindert somit deren Aktivierung und folglich die Transkription der Zielgene (Liem *et al.* 2009, Robbins *et al.* 2012). Bei der Bindung von Hh an Ptch entfernt sich Ptch aus dem Zilium und ermöglicht Smo somit die Translokation von der Plasmamembran oder aus intrazellulären Vesikeln in das Zilium (Corbit *et al.* 2005). Aktiviertes Smo führt weiter dazu, dass Kif7 sich vom Basalkörper zur Spitze des Ziliums bewegt (Robbins *et al.* 2012). Dies wiederum ermöglicht dem SuFu-Gli-Komplex ebenfalls zur Spitze des Ziliums zu wandern. Hier können sich die Gli-Proteine von dem Komplex lösen und in ihre Aktivatorform Gli<sub>A</sub> umgewandelt werden. Gli<sub>A</sub> kann das primäre Zilium verlassen und in den Nucleus gelangen um dort die Transkription der Zielgene zu aktivieren (Tukachinsky *et al.* 2010, Robbins *et al.* 2012, Briscoe und Thérond 2013). Abbildung 3 veranschaulicht schematisch den Hedgehog-Signalweg in Vertebraten.



Abbildung 3: Die schematische Darstellung des Hedgehog-Signalwegs in Vertebraten (Mar et al. 2011) (a) Der Hedgehog-Signalweg in Abwesenheit vom Hedgehog-Liganden (Hh): Im inaktiven Zustand inhibiert der Rezeptor Patched (Ptch) den Rezeptor Smoothened (Smo), indem er verhindert, dass Smo auf das Zilium gelangen kann. Der genaue Mechanismus der Hemmung ist nicht bekannt. Gegebenenfalls sezerniert oder transportiert Ptch Oxysterole welche Smo inhibieren. Die Gli-Proteine befinden sich im Cytoplasma in ihrer inaktivierten Form und bilden gemeinsam mit Supressor of Fused (SuFu) einen Komplex, der die Aktivierung der Gli-Proteine verhindert. Die Repressorform (Gli<sub>R</sub>) kann im Zellkern keine Transkription der Hedgehog-Zielgene initieren. (b) Der Hedgehog-Signalweg in Anwesenheit des Hedgehog-Liganden: Das Hedgehog-Protein bindet an Ptch und führt somit zu dessen Abbau. Folglich wird die Hemmung von Smo aufgehoben, sodass Smo sich in das primäre Zilium bewegen kann. Dies wiederum führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Gli1-3. Aktiviertes Gli (Gli<sub>A</sub>) wandert in den Nukleus und aktiviert die Transkription der Hedgehog-Gene.

Neben dem oben beschriebenen klassischen, beziehungsweise sogenannten kanonischen Hedgehog-Signalweg, existiert des Weiteren noch ein nicht-kanonischer Hedgehog-Signalweg. Hier haben die Transkriptionsfaktoren Gli1-3 keine Bedeutung. Unterteilt wird dieser weiterhin in Typ I, welcher unabhängig von Smoothened abläuft, und Typ II, bei dem Smoothened von Bedeutung ist (Chinchilla *et al.* 2010). Da aber in dieser Arbeit sowohl Smoothened als auch die Gli-Proteine eine zentrale Bedeutung haben, wird im Folgenden nicht näher auf den nicht-kanonischen Weg eingegangen.

## 2.4.2 Die Bedeutung des Hedgehog-Signalwegs in der Hämatopoese

Über den Einfluss des Hedgehog-Signalwegs auf die Hämatopoese existieren in der Literatur kontroverse Daten. Eine Erklärung hierfür ist, dass die Versuche in Bezug auf das Stadium der Hämatopoese, den Versuchsbedingungen und den verwendeten Geweben nicht einheitlich durchgeführt wurden.

In Vertebraten erfolgt die Einteilung der Blutbildung in primitive (embryonale) und definitive (adulte) Hämatopoese. Die primitive Blutbildung findet beim Menschen zwischen der zweiten und dritten Woche post conceptionem statt und erfolgt in Blutinseln im Mesoderm des Dottersacks (Byrd *et al.* 2002, Baron 2003). In Mausembryos ist diese bereits an Embryonaltag 7 (E7) nachweisbar. Hier werden große kernhaltige Erythroblasten sowie Megakaryozyten, Makrophagen und Endothelzellen gebildet (Baron 2003, Lécuyer und Hoang 2004, Golub und Cumano 2013).

Die definitive Hämatopoese ist durch die Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen charakterisiert, die sich im Gegensatz zu den Zellen der primitiven Hämatopoese in alle hämatopoetische Zellreihen ausdifferenzieren können (Baron 2003, Lécuyer und Hoang 2004). In Mäusen werden diese HSCs sowohl im reifen Dottersack, als auch in der para-aortalen Splanchnopleura (SP) und der Aorta-Gonaden-Mesonephros-(AGM)-Region etwa ab Tag E10,5 gebildet (Golub und Cumano 2013). Die gebildeten HSCs siedeln sich in der fetalen Leber an, die den Ort der Hämatopoese bis kurz vor der Geburt darstellt. Schließlich übernimmt, wie im erwachsenen Organismus, das Knochenmark diese Funktion (Baron 2003). Abbildung 4 stellt die verschiedenen Orte der Hämatopoese in der Maus graphisch dar.



# Abbildung 4: Anatomische Lokalisation der Hämatopoese in der Maus (modifiziert nach Chotinantakul und Leeanansaksiri 2012)

In der Maus beginnt die Hämatopoese etwa am Embryonaltag 7 (E7) im Dottersack (yolk sac) und breitet sich dann ab Tag E8,5-10,5 auf die Aorta-Gonaden-Mesonephros-(AGM)-Region aus. Die gebildeten HSCs siedeln sich anschließend in der fetalen Leber an (E11), die bis kurz vor der Geburt den Ort der Hämatopoese darstellt. Im Anschluss fungiert wie im erwachsenen Organismus das Knochenmark als Ort der Hämatopoese.

Dyer *et al.* konnten einen Zusammenhang zwischen Hedgehog-Signalweg und primitiver Hämatopoese beobachten. Sie fanden heraus, dass Ihh von primitivem Endoderm sezerniert wird und

als endogener Aktivator die embryonale Hämatopoese induzieren kann (Dyer et al. 2001). Währenddessen konnten Cridland et al. nachweisen, dass Ihh-Knock-Out-Mäuse eine deutliche Beeinträchtigung in der definitiven Hämatopoese aufwiesen. Diese äußerte sich beispielsweise in einer Anämie mit teilweise letalem Ausgang. Sie stellten weiterhin die Vermutung auf, dass Ihh über einen Einfluss auf die fetale Lebernische in die Hämatopoese eingreifen kann. Eine Wirkung von Ihh auf die primitive Hämatopoese, im Sinne von Anämie oder anormalem Gewicht der zirkulierenden Blutzellen, konnte durch Cridland et al. nicht gezeigt werden (Cridland et al. 2009). Gao et al. konnten in vivo weder in Gain-of-Function- noch in Loss-of-Function-Versuchen einen Zusammenhang zwischen Hedgehog-Signalweg und adulter Hämatopoese oder HSCs bestätigen (Gao et al. 2009). Weitere Forschungsgruppen konnten allerdings beobachten, dass der Signalweg durchaus Einfluss auf die Hämatopoese, beziehungsweise die HSCs nimmt. So führte eine Aktivierung des Signalwegs durch ein ptc-17-Maus-Modell zu gesteigertem Zirkulieren und einer verstärkten Expansion von HSCs (Trowbridge et al. 2006). Ein Verlust von Smo und damit eine Hemmung des Hedgehog-Signalwegs, führte in Smo7-Mäusen zu einer Beeinträchtigung der Selbsterneuerungsfunktion der HSCs (Zhao et al. 2009). Auch konnte eine Beeinflussung der Hämatopoese durch die Hedgehog-Zielgene hergestellt werden. So konnte in Gli1<sup>null</sup>-Mäusen beobachtet werden, dass ein Verlust des Zinkfingerproteins Gli1 zu einer reduzierter Proliferation in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen führte (Merchant et al. 2010).

## 2.4.3 Die Rolle des Hedgehog-Signalwegs in der myeloischen Leukämie

In den letzten Jahren haben sich die Hinweise gehäuft, die dem Hedgehog-Signalweg in den myeloischen Leukämien eine Bedeutung zumessen. In diesem Zusammenhang bestehen derzeit besonders bezüglich der chronischen myeloischen Leukämie (CML) gute Kenntnisse.

Ursache für die Entstehung einer CML ist in über 95% der Fälle die reziproke Translokation t(9;22). Es kommt zu einem BCR-ABL-Fusionsgen mit daraus resultierend gesteigerter Tyrosinkinase-Aktivität (Dierks et al. 2008). Die Einführung eines Tyrosinkinase-Inhibitors, wie dem Imatinib, in die Therapie führte zu einem enorm verbesserten Behandlungsansprechen, da hierdurch der gesteigerten Tyrosinkinase-Aktivität gezielt entgegengewirkt werden kann. Leider entwickeln sich häufig Resistenzen und nach Absetzen des Medikaments Rezidive. Ein Grund hierfür könnte sein, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor nicht auf die leukämischen Stammzellen, sondern lediglich auf Tumorzellen in fortgeschrittenem Reifestadium wirkt und die Tumorstammzellen somit persistieren (Irvine und Copland 2012). Zhao et al. konnten in ihren Versuchen mit Smo<sup>-/</sup>-Mäusen zeigen, dass die LSCs bei deletiertem Smo reduziert waren und dass nach Transplantation der LSCs sowohl eine verminderte Inzidenz als auch eine längere Latenzzeit bestanden. Im Gegensatz hierzu führte aktiviertes Smo in transgenen Mäusen zu einer erhöhten Anzahl an LSCs (Zhao et al. 2009). Die Ergebnisse von Dierks et al. ergaben ebenfalls eine reduzierte Entstehung von CML in Mäusen nach Transplantation von BCR-ABL-positiven Zellen, bei denen die Expression von Smo ausgeschaltet wurde. Des Weiteren resultierte eine herabgesetzte Anzahl an LSCs nach pharmakologischer Hemmung von Smo in vivo (Dierks et al. 2008).

Über die genaue Bedeutung des Hedgehog-Signalwegs in der AML sind bisher weniger detaillierte Erkenntnisse bekannt als für die CML. Dies liegt unter anderem daran, dass die AML eine sehr

heterogene Erkrankung ist und ihrer Entstehung viele verschiedene genetische und molekulare Ursachen zu Grunde liegen können. In Patienten mit AML konnte im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöhte Interleukin-6-(IL-6)-Plasmaspiegel und eine erhöhte Shh-Expression in Knochenmark und Blut gefunden werden. In der humanen AML-Zelllinie HL60 kam es durch Stimulation mit IL-6 zudem zu einer Erhöhung von Shh und Gli1. Dies wiederum führte zu einem steigenden Zellüberleben der AML-Zellen (Su *et al.*). Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung des Hedgehog-Signalwegs am Überleben der AML-Zellen und konnten durch Beobachtungen von Kobune *et al.* unterstützt werden. Diese konnten beobachten, dass der Hedgehog-Signalweg eine Beteiligung am Überleben und der Resistenzentwicklung von CD34<sup>+</sup>-Leukämiezellen spielt. CD34<sup>+</sup>-Leukämiezellen zeigten eine Expression der Gli-Proteine Gli1 und Gli2 und hierdurch eine Verbindung zum Hedgehog-Signalweg. Eine Hemmung der Hedgehog-Signalkaskade durch den Einsatz des Smo-Inhibitors Cyclopamin führte in verschiedenen AML-Zelllinien zu einer erhöhten Chemotherapiesensitivität gegenüber AraC (Kobune *et al.* 2009). Hieraus lässt sich eine Bedeutung des Hedgehog-Signalwegs an der Entwicklung von Chemotherapieresistenzen vermuten.

## 2.4.4 Der Hedgehog-Signalweg in soliden Malignomen

In Hinblick auf verschiedene solide Tumorerkrankungen besitzt der Hedgehog-Signalweg einen wichtigen Stellenwert. Vor allem ist seine Bedeutung für das Basalzellkarzinoms (BCC) und für das Medulloblastom, einen bösartigen Tumor des Kleinhirns, bewiesen. Mutationen in dem Tumorsupressorgen Ptch können zur Inaktivierung desselben führen und sind eine häufige Ursache in der Entstehung von sporadischen BCCs. Durch Inaktivierung von Ptch wird die Hemmung auf Smo aufgehoben und es resultiert eine unkontrollierte Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs. In 70% (Li et al. 2011) bis 90% (Caro und Low 2010) der BCCs konnte eine Veränderung im Ptch-Gen nachgewiesen werden. Auch wenn dies prozentual den größten Anteil an Mutationen des Hedgehog-Signalwegs ausmacht, sind noch weitere Mutationen bekannt. So führten unter anderem ebenfalls die Überexpression von Shh (Oro et al. 1997), eine Gain-of-Function-Mutationen in dem Protoonkogen Smo (Xie et al. 1998) und Veränderungen in Gli1 und Gli2 zu einer übermäßigen Aktivierung des Signalwegs und somit zu einer Begünstigung in der BCC-Entstehung (Li et al. 2011). Neben der sporadisch auftretenden Form existieren auch erbliche Basalzellkarzinome. In diesem Zusammenhang ist vor allem das sogenannte Gorlin-, beziehungsweise Basalzellnävus-Syndrom zu erwähnen. Dieses stellt eine autosomal-dominante Erbkrankheit dar, bei der betroffene Patienten unter anderem an odontogenen Kieferzysten, Skelettabnormalitäten, Hyperkeratosen der Hand- und Fußflächen und Verkalkungen der Falx cerebri leiden. Zusätzlich weisen sie ein vermehrtes Auftreten verschiedener Tumorentitäten auf. Darunter fallen vor allem Basalzellkarzinome, Medulloblastome und Rhabdomyosarkome (Johnson et al. 1996, Unden et al. 1996, Lo Muzio 2008, Joshi et al. 2012, Fini et al. 2013). 50-85% dieser Patienten zeigen eine Mutation in dem Gen Ptch-1 (Pastorino et al. 2009).

Die Ätiologie sporadischer Medulloblastome hängt zum Teil ebenfalls mit inaktivierenden Mutationen von Ptch zusammen (Corey *et al.* 1997).

## 2.4.5 Der klinische Einsatz von Smoothened-Inhibitoren

Um bei Tumorerkrankungen therapeutisch in den Hedgehog-Signalweg eingreifen zu können, stellt der Smoothened-Rezeptor ein geeignetes Target dar. In den letzten Jahren wurden verschiedene Substanzen getestet, die an diesem Rezeptor ansetzen und die mittlerweile zum Teil bereits in Phase-II-Studien angewendet werden. Der in dieser Arbeit verwendete Smo-Inhibitor PF-04449913 (Pfizer, New York, New York, USA) wird bei fortgeschrittenen hämatologischen Tumorerkrankungen ebenfalls in Phase-II-Studien eingesetzt. In einer Dosiseskalationsstudie wurden insgesamt 32 Patienten mit AML, CML, chronische myelomonozytische Leukämie (CMML), Myelofibrose (MF) und myelodysplastischem Syndrom (MDS) eingeschlossen. Ein Ansprechen auf die Behandlung mit PF-04449913 zeigte sich bei allen Patienten in unterschiedlicher Ausprägung und Qualität. Unter anderem erreichte eine Patientin mit aus CMML entwickelter AML eine komplette Remission. Weitere Patienten mit AML zeigten unter Therapie mit PF-04449913 eine deutlich reduzierte Blastenanzahl im Knochenmark. Bei relativ guter Verträglichkeit zeigten sich unerwünschte Arzneimittelwirkungen im Sinne von Alopezie, Übelkeit, Geschmackstörungen und Athralgien (Jamieson et al. 2011). Aktuell werden für weitere Studien mit PF-04449913 Patienten rekrutiert, unter anderem für die Phase-II-Studie NCT01546038, welche Patienten mit AML oder MDS einschließt. Bei Patienten in gutem Allgemeinzustand wird der Smo-Inhibitor hier in der Konsolidierungstherapie in Kombination mit den Chemotherapeutika AraC und Daunorubicin getestet. Des Weiteren werden Patienten in reduziertem Allgemeinzustand randomisiert entweder mit niedrigdosiertem AraC in Kombination mit PF-04449913 oder ausschließlich mit niedrigdosiertem AraC behandelt (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01546038 2012). Im April 2013 wurde die Phase-II-Studie NCT01841333 gestartet und endet voraussichtlich 2019. Die anhaltende Rekrutierung umfasst Patienten mit akuten Leukämien, die ein hohes Rezidivrisiko nach allogener Stammzelltransplantation aufweisen. Diese werden etwa 80 Tage nach erfolgter Stammzelltransplantation einer Behandlung mit PF-04449913 unterzogen (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01841333 2013).

Ein weiteres Beispiel für einen klinisch angewandten Smoothened-Antagonisten ist das GDC-0449 (Vismodegib). GDC-0449 zeigte in der Phase-I-Studie NCT00833417 ein Tumoransprechen von 58% in metastasierten und lokal fortgeschrittenen BCCs (Sekulic *et al.* 2012, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00833417 2009). Im Januar 2012 folgte eine Zulassung von GDC-0449 durch die *Food and Drug Administration (FDA)* zur Behandlung von Basalzellkarzinomen (Cirrone und Harris 2012). Eine Phase-II-Studie untersucht GDC-0449 derzeit in Zusammenhang mit dem Gorlin-Syndrom (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00957229 2009). Weitere Tumorerkrankungen, die Bestandteil von Phase-I- und Phase-II-Studien mit GDC-0449 sind, sind beispielsweise das metastasierte Kolonkarzinom (NCT00636610), das fortgeschrittene kleinzellige Bronchialkarzinom (NCT00887159) und das Pankreaskarzinom (NCT01064622) (ClinicalTrials.gov).

# 3 Material und Methoden

# 3.1 AML-Zelllinien

In den verschiedenen Versuchen wurden drei unterschiedliche Suspensionszelllinien verwendet. Diese wurden bei der American Type Culture Collection (ATCC) käuflich erworben.

# 3.1.1 SKM-1

Die SKM-1-Zelllinie ist eine humane AML-Zelllinie. Sie wurde im Jahre 1989 aus einem 76-jährigen Mann aus Japan isoliert, der an einer aus myelodysplastischen Syndrom entstandenen akuten myeloischen Leukämie erkrankt war.

# 3.1.2 Kasumi-1

Auch die Kasumi-1-Zelllinie ist eine humane AML-Zelllinie. Sie stammt aus dem Jahr 1989 von einem 7-jährigen Jungen aus Japan mit AML (FAB M2); t(8;21) Chromosomentranslokation.

# 3.1.3 U937

Die U937-Zellinie, ebenfalls eine humane AML-Zelllinie, wurde 1974 aus einem 37-jährigen Mann isoliert. Dieser litt unter einem diffus generalisierten histiozytärem Lymphom.

# 3.2 Der Smoothened-Inhibitor PF-04449913

Der Smoothened-Inhibitor PF-04449913 mit der chemischen Formel 1-((2*R*,4*R*)-2-(1*H*-Benzo[*d*]imidazol-2-yl)-1-Methylpiperidin-4-yl)-3-(4-Cyanophenyl)Urea (Pfizer, New York, USA) ist ein oral bioverfügbarer kleinmolekularer Inhibitor des Rezeptors Smoothened. Der pulverförmige Stoff mit einem Molekulargewicht von 447g/l wurde bei 4°C und lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt.

Vor Gebrauch wurde das Pulver in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und so eine Konzentration von 1 mM (Stock I) hergestellt. Dieser Stock I konnte lichtgeschützt 14 Tage aufbewahrt und bei Bedarf mit Dulbeco's Phosphate-Buffered Saline (PBS, Invitrogen, Carlsbad, USA) auf eine Konzentration von 0,1 µM (Stock II) verdünnt werden. Stock II musste bei Gebrauch stets neu hergestellt werden.

# 3.3 Das rekombinante humane Sonic Hedgehog-Protein 1314-SH/CF

In Vertebraten gibt es drei verschiedene Hedgehog-Proteine, das Desert Hedgehog (Dhh), das Indian Hedgehog (Ihh) und das Sonic Hedgehog (Shh). In den Versuchen dieser Arbeit wurde das rekombinante humane N-terminale Sonic Hedgehog-Protein 1314-SH/CF (R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet und in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Das humane Shh ist ein Vorläuferprotein mit einer Molekülmasse von 45 kDa, das sich mittels Autokatalyse in ein 19 kDa schweres N-terminales Protein und ein 25 kDa schweres C-terminales Protein spaltet.

# 3.4 Kultivierung der Zelllinien

Für alle drei verwendeten Zelllinien wurde das Kultivierungsmedium RPMI-1640 GlutaMAX<sup>™</sup> (Biochrom, Berlin) verwendet, welches zusätzlich mit FBS (Fetal Bovine Serum) (Biochrom, Berlin) versetzt wurde. Die FBS-Konzentration in den Medien unterschied sich für die verschiedenen Zelllinien. Das Medium für SKM-1 und U937 enthielt 10% FBS, während das Medium der Kasumi-1-Zellen mit 20% FBS hergestellt wurde.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> in einem Zellkultur-Inkubator (Labotect, Göttingen). In der Regel wurden die Zellen zwei bis drei Mal pro Woche gesplittet, wobei ein Teil verworfen wurde während zu dem übrigen Zellen frisches Medium hinzu gegeben wurde.

## 3.5 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet.

Zu Beginn wurden 10 µl Zellsuspension in dem Verhältnis 1:10 in Trypanblau verdünnt und hiervon 10 µl auf die Neubauer Zählkammer unter ein Deckgläschen gegeben. Die Zellen auf vier Quadranten wurden ausgezählt und die Zellzahl pro Milliliter mit folgender Formel errechnet:

Zellzahl der vier Quadranten / 4 x 10 x 10000 = Zellzahl / ml

## 3.6 Proliferations-Assays

Um den Einfluss des Smoothened-Inhibitors auf das Wachstum, beziehungsweise die Vermehrung der Zellen zu untersuchen, wurden Proliferations-Assays über einen Zeitraum von drei Tagen und im Anschluss für die Dauer von 14 Tage angesetzt. Für die Kurzzeitproliferationen wurden die Zelllinien SKM-1 und U937 verwendet, während unter Langzeitbehandlung zusätzlich die AML-Zelllinie Kasumi-1 und ergänzend zum Smo-Inhibitor der Effekt des Hedgehog-Protein Shh untersucht wurden.

# 3.6.1 Vorversuch zur Ermittlung der optimalen FBS-Konzentration für die Proliferations-Assays

In dem Vorversuch wurde die optimale Menge des zu dem Medium hinzuzufügenden FBS ermittelt, die sowohl während der Kurz- als auch während der Langzeitproliferation verwendet werden sollte. Hierfür wurden verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen FBS-Konzentrationen angesetzt. An Tag 3 wurden die Zellen im Verhältnis 1:1 gesplittet, mit frischem Medium versehen und die Zellen an Tag 7 mittels ViCell-Gerätes der Fa. Beckman Coulter (Brea, CA, USA) ausgezählt und die Vitalität bestimmt.

Die im Versuch untersuchten Konzentrationen waren die Folgenden:

Für SKM-1 und U937:

- 1.) 10% FBS
- 2.) 5% FBS
- 3.) 1% FBS
- 4.) 0,1% FBS

Da das Standard-Medium der Kasumi-1-Zellen mit 20% FBS versetzt wird, wurde für diese Zelllinie ein zusätzlicher Ansatz mit 20% FBS angesetzt:

# 3.6.2 Proliferation von AML-Zelllinien unter Stimulation mit dem Smoothened-Inhibitor PF-04449913

Mit Hilfe des Proliferations-Assays wurde das Wachstumsverhalten der AML-Zelllinien SKM-1 und U937 unter dem Einfluss des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 über eine Dauer von drei Tagen analysiert.

Die Wirkung des Inhibitors wurde in niedriger Konzentration (0,1 µM) und hoher Konzentration (1 µM) untersucht. Als Kontrolle diente ein DMSO-Ansatz, welcher die gleiche DMSO-Menge wie der hochdosierten Inhibitor enthielt. Für den Proliferationsversuch der SKM-1-Zellen wurde darüber hinaus zusätzlich ein völlig unbehandelter Kontrollansatz (Nullkontrolle) verwendet.

In einer 24-Well-Platte (Greiner, Frickenhausen) wurden für die SKM-1-Zellen zwölf Ansätze und für die U937-Zellen neun Ansätze mit je 5 ×  $10^5$  Zellen in je 500 µl 10%igen Medium ausplattiert. Durch Stimulation mit Smoothened-Inhibitor und DMSO ergaben sich folgende Ansätze als Triplikate:

- 1.) Smo (1 µM)
- 2.) Smo (0,1 μM)
- 3.) DMSO-Kontrolle 1 (entspricht DMSO-Menge von 1 µM Smo)

Zusätzlich für die SKM-1-Zelllinie:

4.) Nullkontrolle

Die Ansätze wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. An Tag 3 wurde die Zellzahl mit Hilfe des ViCells bestimmt.

# 3.6.3 Langzeitproliferation unter Stimulation mit dem Smoothened-Inhibitor PF-04449913 und dem Hedgehog-Protein Shh

In diesem Versuch wurde die Proliferation der Zellen unter Einfluss des Smoothened-Inhibitors und von Shh über einen Zeitraum von zwei Wochen untersucht.

In einer 24-Well-Platte wurden 15 Ansätze mit je 5 ×  $10^5$  Zellen in je 500 µl 10%igen (U937 und SKM-1), beziehungsweise 20%igen (Kasumi-1) Medium ausplattiert. Durch Stimulation mit Smoothened-Inhibitor, DMSO und Shh ergaben sich folgende Triplikate:

- 1.) Smo (1 µM)
- 2.) Smo (0,1 μM)
- 3.) DMSO-Kontrolle 1 (entspricht DMSO-Menge von 1 µM Smo)
- 4.) DMSO-Kontrolle 2 (entspricht DMSO-Menge von 0,1 µM Smo)
- 5.) Shh (5 nM)

Diese Ansätze wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO2 im Brutschrank für zwei Wochen inkubiert.

An Tag 3, Tag 7, Tag 10 und Tag 14 wurde die Zellzahl mit Hilfe des ViCell-Geräts bestimmt. Hierfür wurden die Zellen an den oben genannten Tagen im Verhältnis 1:1 gesplittet um die eine Hälfte auszuzählen und die andere Hälfte von Neuem mit Medium zu versetzen, zu stimulieren und am nächsten Termin auszuzählen.

# 3.7 Colony-Assays

Mittels Colony-Assay kann die Fähigkeit zur Koloniebildung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen untersucht werden. Dies erfolgt in semi-solidem Medium durch welches die Zellbewegung reduziert und so die Koloniebildung ermöglicht wird.

In diesem Versuch sollte untersucht werden, inwieweit sich die Zugabe des Smoothened-Inhibitors auf die Koloniebildung der Leukämiezellen auswirkt. Vorversuche ergaben, dass sich die Kolonien der Zelllinie U937 zu weitläufig darstellten und aufgrund fehlender Abgrenzung untereinander nicht separierbar waren. Aus diesem Grund wurde der Versuch lediglich mit den Zelllinien SKM-1 und Kasumi-1 durchgeführt.

Für den Colony-Assay wurde das semi-solide humanspezifische Medium MethoCult H4230 (STEMCELL Technologies, Grenoble, Frankreich) verwendet. Zu je 4 ml Medium wurden 400 μl Zellsuspension hinzugegeben, sodass sich eine Endkonzentration von 5500 Zellen/ml ergab. Es wurden insgesamt vier Ansätze hergestellt und jeweils zwei mit Inhibitor (1 μM) und zwei mit DMSO stimuliert. Die Ansätze wurden kurz gevortext und eine Stunde ruhen gelassen. Im nächsten Schritt wurde zu der Hälfte der Ansätze das Hedgehog-Protein Shh hinzugefügt. Es ergaben sich folgende Ansätze:

- 1.) Smo (1 µM)
- 2.) Smo (1 µM) + Shh (5 nM)
- 3.) DMSO-Kontrolle (entspricht DMSO-Menge von 1 µM Smo)
- 4.) DMSO-Kontrolle (entspricht DMSO-Menge von 1 µM Smo) + Shh (5 nM)

Nach erneutem Vortexen und einer Ruhezeit von fünf Minuten wurden von jedem Ansatz 3 × 1,1 ml in drei kleine Petrischalen gegeben und flächendeckend darauf verteilt, sodass aus jedem Ansatz Triplikate hergestellt und insgesamt zwölf Petrischalen bestückt wurden. Die entstandenen Luftblasen wurden mittels Pipette vorsichtig entfernt und die Petrischalen abgedeckt.

Jeweils sechs dieser Ansätze wurden zusammen mit einer offenen Petrischale, gefüllt mit *Aqua dest.*, zur Befeuchtung in einer großen abgedeckten quadratischen Petrischale im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> konserviert. Nach etwa zwei Wochen erfolgte die Auszählung der einzelnen Kolonien unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena).

# 3.8 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde an SKM-1-, Kasumi-1- und U937-Zelllinien durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach entsprechender Stimulation geerntet und anschließend mit PBS gewaschen. Das entstandene Zellpellet wurde bei -80°C eingefroren. Die Isolierung erfolgte gemäß Herstellerangaben durch das RNeasy-Kit mit RNase-Free-DNase Set zum DNA-Verdau (Qiagen, Hilden). Nachdem die hergestellte RNA in 30 µl DEPC-behandeltem Wasser (Invitrogen, Carlsbad, USA) resuspendiert wurde, konnte deren Konzentration mittels Nandrop-1000 (Peqlag, Erlangen) ermittelt werden.

# 3.9 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Herstellung wurden entweder 5 µg oder 2 µg RNA eingesetzt und mittels Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare, Fairfield, USA) und zusätzlichem Random Primer (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Vor Gebrauch der cDNA wurde diese entsprechend der verwendeten RNA-Menge entweder im Verhältnis 1:5 oder 1:2 in DEPC-behandeltem Wasser (Invitrogen) verdünnt.

# 3.10 Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR dient der *in vitro*-Amplifizierung bestimmter Gen-Sequenzen in vorhandener DNA und läuft in verschiedenen Schritten ab. Zunächst erfolgt die Denaturierung, bei der die DNA-Doppelstränge durch Lösen der Wasserstoffbrücken mittels Erhitzen auf meist 94-96°C in Einzelstränge separiert werden. Es folgt das Annealing. Hier lagern sich die verwendeten komplementären Primer an das jeweilige entsprechende DNA-Stück an. Dies findet bei Primer-spezifischer Temperatur (55-65°C) statt. Die anschließende Elongation erfolgt sowohl in 5' $\rightarrow$ 3' (forward Primer) als auch in 3' $\rightarrow$ 5' (reverse Primer) mittels DNA-Polymerase und bei Polymerase-spezifischer Temperatur. Durch vielfache Wiederholung der Durchgänge kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung der Gen-Sequenzen. Die Analyse des Produktes bezüglich Größe und Reinheit ist durch Gelelektrophorese möglich.

In dieser Arbeit wurden die PCRs mit Hilfe des LightCycler (Roche, Basel, Schweiz) und dem FAST Start DNAMaster Sybr Green Kit (Roche) durchgeführt. Ein hinzugegebener DNA-Fluoreszenzfarbstoff (SYBRGreen) lagert sich in die synthetisierten DNA-Amplifikationen ein. Die Fluoreszenz wird mit Hilfe des LightCyclers detektiert und das Produkt so quantifiziert. Durch Einsatz einer Standardreihe in vier verschiedenen log-Verdünnungskonzentrationen (10<sup>-4</sup> - 10<sup>-7</sup>), welche aus Plasmiden und der zu untersuchenden cDNA hergestellt wurden, konnte eine Einschätzung der relativen Menge der synthetisierten cDNA vorgenommen werden. Die Plasmide wurden von der Firma Biocat (Heidelberg) käuflich erworben.

# 3.10.1 Quantitative Real-Time-PCR-Analyse von SKM-1, Kasumi-1 und U937 nach Stimulation mit Smoothened-Inhibitor und Shh

Es sollte der Effekt der Stimulation mit Smoothened-Inhibitor und Shh auf die Expression der Downstream-Signale Gli1-3 und der Stammzellgene KLF4 (Kruppel-like factor 4), LKB1 (Liver Kinase B1), NANOG, POU5F1 (Octamer binding transcription factor 4), PRDM14 (PR domain containing 14) und SOX2 (SRY box2) in den verschiedenen AML-Zelllinien untersucht werden.

Hierfür wurden an Tag -1 acht Mal 3 ×  $10^6$  Zellen mit jeweils 2 ml Hungermedium in T-25-Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht) ausplattiert und bis zum nächsten Tag im Brutschrank bei 37°, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Ansätze entweder mit hochdosierten Smoothened-Inhibitor (1 µM) oder DMSO, sodass folgende Ansätze in vierfacher Ausgabe entstanden:

- 1.) Smo (1 µM)
- 2.) DMSO-Kontrolle (entspricht DMSO-Anteil von 1 µM Smo)

Diese Ansätze wurden für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Shh zu einer Hälfte der Ansätze, wodurch sich folgende Duplikate ergaben:

- 1.) Smo (1 µM)
- 2.) Smo (1 µM) + Shh (5 nM)
- 3.) DMSO-Kontrolle (entspricht DMSO-Anteil von 1 µM Smo)
- 4.) DMSO-Kontrolle (entspricht DMSO-Anteil von 1  $\mu$ M) + Shh (5 nM)

Acht Stunden nach Zugabe des Smoothened-Inhibitors, beziehungsweise von DMSO wurde die Hälfte der Proben geerntet. Die andere Hälfte der Ansätze wurde weitere 16 Stunden im Brutschrank belassen und nach insgesamt 24 Stunden Inkubationszeit geerntet.

Zum Ernten wurden die Proben in der Zentrifuge bei 20°C und 300 g fünf Minuten zentrifugiert und der dabei entstandene Überstand entfernt. Im Anschluss wurde jeder Ansatz mit 5 ml PBS gewaschen und noch einmal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das übrig gebliebene Pellet bei -80°C eingefroren. Es schloss sich die RNA-Isolierung und Überführung in cDNA, wie oben beschrieben, an. Die Analyse der Genexpression erfolgte mittels LightCycler. Genauere Informationen zu den verwendeten Primer sowie zu den PCR-Bedingungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

|         |                      |                          |                      | Annealing-Temperatur,            |  |
|---------|----------------------|--------------------------|----------------------|----------------------------------|--|
| Gen     | Primer               | Sequenz                  | Amplifikatgröße (bp) | MgCl <sub>2</sub> -Konzentration |  |
| GAPDH   | GAPDH forward        | tgatgacattcaagaaggtgg    | 246                  | 61°C, 4mM                        |  |
| GAPDH   | GAPDH reverse        | tttcttactccttggaggcc 246 |                      | 61°C, 4mM                        |  |
| hGli 1  | hGli 1 forward 1594  | ctacatcaactccggccaat 155 |                      | 61°C, 3mM                        |  |
| hGli1   | hGli1 reverse 1748   | cggctgacagtataggcaga 155 |                      | 61°C, 3mM                        |  |
| hGli 2  | hGli 2 forward 1080  | caccaaccagaacaagcaga     | 246                  | 61°C, 3mM                        |  |
| hGli2   | hGli2 reverse 1325   | acctcagcctcctgcttaca     | 246                  | 61°C, 3mM                        |  |
| hGli 3  | hGli 3 forward 883   | ggccatccacatggaatatc     | 196                  | 59°C, 3mM                        |  |
| hGli3   | hGli3 reverse 1078   | tgaagagctgctacgggaat     | 196                  | 59°C, 3mM                        |  |
| hLKB-1  | hLKB-1 forward 1288  | gctcttagggcaaggtgaag     | 153                  | 60°C, 3mM                        |  |
| hLKB-1  | hLKB-1 reverse 1440  | ttttgtgccgtaacctcctc     | 153                  | 60°C, 3mM                        |  |
| hKLF4   | hKLF4 forward 1630   | cccaattacccatccttcct     | 210                  | 59°C, 3mM                        |  |
| hKLF4   | hKLF4 reverse 1836   | tgccttgagatgggaactct     | 210                  | 59°C, 3mM                        |  |
| hNANOG  | hNANOG forward 297   | gatttgtgggcctgaagaaa     | 155                  | 57°C, 3mM                        |  |
| hNANOG  | hNANOG reverse 451   | aagtgggttgtttgcctttg     | 155                  | 57°C, 3mM                        |  |
| hPOU5F1 | hPOU5F1 forward 864  | gaaggatgtggtccgagtgt     | 183                  | 61°C, 3mM                        |  |
| hPOU5F1 | hPOU5F1 reverse 1046 | gtgaagtgagggctcccata     | 183                  | 61°C, 3mM                        |  |
| hPRDM14 | hPRDM14 forward 1460 | aagtacacccctgtgtgga      | 196                  | 61°C, 3mM                        |  |
| hPRDM14 | hPRDM14 reverse 1655 | cagagtggactcgcatgtgt     | 196                  | 61°C, 3mM                        |  |
| hSOX2   | hSOX2 forward 614    | aacccaagatgcacaactc      | 152                  | 59°C, 3mM                        |  |
| hSOX2   | hSOX2 reverse 765    | cggggccggtatttataatc     | 152                  | 59°C, 3mM                        |  |

Tabelle 2 Primer und PCR-Bedingungen

# 4 Ergebnisse

# 4.1 Vorversuch zur Ermittlung der optimalen FBS-Konzentration des Mediums für die nachfolgenden Proliferations-Assays

Um für die Kurz- und Langzeitproliferationen das optimale Medium verwenden zu können, wurde vorab ein Mediumtestversuch durchgeführt. Mit diesem wurde die Zellvitalität der drei Zelllinien in Abhängigkeit unterschiedlich hoher FBS-Konzentrationen im Medium über einen Zeitraum von einer Woche untersucht. Hierzu wurde Medium in vier, beziehungsweise fünf verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die jeweils höchste Konzentration entsprach jener des entsprechenden Kultivierungsmediums. Demnach betrug der FBS-Gehalt für die Zelllinien SKM-1 und U937 10% und für die Kasumi-1-Zelllinie 20%. Zusätzlich wurde die Zellvitalität in 5%igen, 1%igen und 0,1%igen Medium untersucht.

Mit abnehmender FBS-Konzentration lässt sich eine deutliche Reduktion in der Vitalität der einzelnen Zellen beobachten. Für die SKM-1- und U937-Zelllinien zeigt sich diese eindeutig ab einer FBS-Konzentration von 1% abwärts, während bei den Kasumi-1-Zellen bereits bei 5% iger FBS-Konzentration eine prägnante Verminderung der Vitalität zu beobachten ist. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 graphisch dargestellt.



Abbildung 5: Die Zellvitalität in Abhängigkeit von der FBS-Konzentration des Mediums

Die Zellvitalität des Kultivierungsmediums (20% FBS für Kasumi-1-Zellen, beziehungsweise 10% FBS für die SKM-1- und U937-Zellen) wurde auf 100% gesetzt.

Abkürzung: FBS = Fetal Bovine Serum.

Unter Berücksichtigung dieses Mediumtestversuchs wurde für die anschließenden Proliferationsversuche das jeweilige Kultivierungsmedium, entsprechend dem höchsten FBS-Anteil, verwendet. Hiermit sollte auch über einen Zeitraum von 14 Tagen eine möglichst hohe Zellvitalität gewährleistet werden.

## 4.2 Einfluss des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 auf das Proliferationsverhalten der AML-Zelllinien

Mit Hilfe der Proliferations-Assays wurde der Effekt des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 auf das Zellwachstum und die Zellvitalität der AML-Zellen untersucht. Hierfür wurde die Proliferation der Zelllinien SKM-1 und U937 nach Applikation zwei verschiedener Inhibitorkonzentrationen (1 µM und 0,1 µM) analysiert. Der DMSO-Ansatz, entsprechend der Menge DMSO die zur Herstellung des hochdosierten Inhibitors (1 µM) verwendet wurde, wurde im Sinne einer Nullkontrolle als Referenz verwendet. In der Versuchsreihe mit der SKM-1-Zelllinie wurde zusätzlich ein vollständig unbehandelter Ansatz untersucht um zu sehen inwieweit das DMSO die Zellproliferation beeinflusst. Dieser native Ansatz wird im Folgenden als Nullkontrolle bezeichnet. Alle Ansätze wurden in dreifacher Ausführung hergestellt und die Versuche jeweils zweimal durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurden die Zellen am ViCell-Gerät ausgezählt.

Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, führte die Behandlung der SKM-1-Zellen mit dem niedrig dosierten Inhibitor (0,1 µM) in dem ersten Versuch zu einem deutlichen Rückgang der Proliferation. Dieser hemmende Effekt auf das Zellwachstum war in der wiederholten Durchführung des Versuchs nicht rekonstruierbar. Der hochdosierte Inhibitor zeigte keine eindeutige Tendenz. Auch der DMSO-Ansatz führte im Vergleich zu der Nullkontrolle der SKM-1-Zellen zu keiner prägnanten Veränderung im Proliferationsvermögen der Zellen (a). Bei Stimulation der U937-Zellen zeigte sich weder durch den niedrigdosierten noch den hochdosierten Inhibitor ein proliferationshemmender oder –fördernder Effekt (b). Es lässt sich dementsprechend zusammenfassend kein eindeutiger Effekt des Smoothened-Inhibitors auf das Zellwachstum der Zellen ausmachen.



Abbildung 6: Der Einfluss des Smo-Inhibitors auf die Proliferation in den AML-Zelllinien SKM-1 und U937 In den beiden Grafiken (a, b) ist die relative Proliferation der beiden Zelllinien in Abhängigkeit der Stimulation mit dem Smo-Inhibitor und DMSO dargestellt. Für die SKM-1-Zelllinie wurde zusätzlich ein nativer Ansatz (Nullkontrolle) ohne DMSO-Anteil verwendet. Die Proliferation des DMSO-Ansatzes wurde auf 100% gesetzt. Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Inh = Smoothened-Inhibitor.

## 4.3 Einfluss des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 und des Hedgehog-Proteins Shh 1314-SH/CF auf die Langzeitproliferation der AML-Zelllinien

Da sich nach drei Tagen in den durchgeführten Proliferations-Assays kein nennenswerter Effekt des Smo-Inhibitors nachweisen ließ, wurde die Proliferation der Zelllinien Kasumi-1, SKM-1 und U937 über einen längeren Zeitraum hinweg analysiert. Der Einfluss des Smo-Inhibitors wurde hierbei in hoher (1 µM) sowie niedriger (0,1 µM) Konzentration untersucht. Dementsprechend wurden zwei Nullkontrollen verwendet. Die DMSO-Kontrolle 1 entspricht der Menge DMSO des hochdosierten und DMSO-Kontrolle 2 der Menge DMSO des niedrigdosierte Inhibitors. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit dem Hedgehog-Protein Shh (5 nm) behandelt. Hiermit sollte analysiert werden, ob eine Stimulierung des Hedgehog-Signalwegs durch einen Hedgehog-Liganden zu einer Zunahme der Proliferationsrate führt. Alle Versuchsansätze wurden als Triplikate hergestellt und jeder Versuch zweimal durchgeführt. Der Zeitraum der Langzeitproliferation betrug 14 Tage. Die absolute Zellzahl wurde alle drei bis vier Tage detektiert und die Ansätze dann erneut mit Inhibitor, DMSO sowie Shh versetzt.

Aus Abbildung 7 wird ersichtlich, dass sich in den verschiedenen Ansätzen durch Stimulation mit Inhibitor oder Shh nur sehr geringe Unterschiede ergaben. Insgesamt lässt sich kein eindeutiger Effekt des Inhibitors oder des Hedgehog-Proteins, im Sinne einer proliferationshemmenden, beziehungsweise proliferationsfördernden Wirkung auf die untersuchten Zelllinien feststellen.



Abbildung 7: Langzeitproliferation unter kontinuierlicher Stimulation mit dem Smo-Inhibitor und Shh Der Ansatz DMSO 1 enthält die gleiche Menge DMSO wie der 1 µM Inhibitor-Ansatz und DMSO 2 entspricht der DMSO-Menge des 0,1 µM Ansatzes.

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

# 4.4 Einfluss des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 und der Effekt des Hedgehog-Proteins Shh 1314-SH/CF auf die Colony-Formations-Kapazität der AML-Zelllinien

AML-Stammzellen besitzen ebenso wie hämatopoetische Vorläuferzellen die Fähigkeit Kolonien zu bilden. Diese Eigenschaft kann mittels Colony-Assay dargestellt und somit das Wachstumsverhalten der AML-Zellen untersucht werden. Dieser Versuch wurde mit den AML-Zelllinien Kasumi-1, SKM-1 und U937 durchgeführt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 500 Zellen/ml ausplattiert und mit dem Smoothened-Inhibitor oder dem Hedgehog-Protein Shh, beziehungsweise mit einer Kombination aus Smoothened-Inhibitor und Shh behandelt. Der Colony-Assay mit den Zelllinien Kasumi-1 und SKM-1 wurde jeweils drei Mal durchgeführt. Die einzelnen Ansätze wurden als Triplikate hergestellt und nach sieben bis zehn Tagen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Zur besseren Übersicht wurden die drei Versuche im Folgenden zusammengefasst und graphisch dargestellt (Abbildung 8). Sowohl die Kasumi-1-, als auch die SKM-1-Zelllinie zeigten nach Ablauf von sieben bis zehn Tagen in den verschiedenen Ansätzen nur geringfügige Unterschiede in der relativen Koloniezahl. Aufgrund der relativ hohen Standardabweichung in den Kasumi-1-Zellen können die dargestellten Veränderungen nicht als relevant bezeichnet werden. Die gebildeten Kolonien der Zelllinie U937 stellten sich lichtmikroskopisch sehr weitläufig dar, sodass eine Abgrenzung der einzelnen Kolonien untereinander und somit das Auszählen dieser nicht eindeutig möglich war. Eine graphische Darstellung hiervon folgt im Weiteren nicht.



Abbildung 8: Der Einfluss des Smo-Inhibitors und von Shh auf die Koloniebildung der Zelllinien Kasumi-1 und SKM-1 Der DMSO-Ansatz enthält die gleiche Menge DMSO wie der Inhibitor-Ansatz. Die relative Koloniezahl des DMSO-Ansatzes wurde auf 100% gesetzt.

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

# 4.5 Einfluss des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 und des Hedgehog-Proteins Shh 1314-SH/CF auf die mRNA-Expression der verschiedenen AML-Zelllinien

Durch quantitative PCR-Analysen wurde der Einfluss des Smoothened-Inhibitors und des Hedgehog-Proteins Shh auf die mRNA-Expression verschiedener Gene in den AML-Zelllinien Kasumi-1, SKM-1 und U937 untersucht. Die Versuche wurden mit allen drei untersuchten Zelllinien mindestens zweimal durchgeführt. Hierbei wurde jeweils die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Gli1, Gli2 und Gli3 sowie verschiedener Stammzellgene acht Stunden, beziehungsweise 24 Stunden nach Stimulation mit der jeweiligen Substanz ermittelt.

# 4.5.1 Auswirkungen des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 und des Hedgehog-Proteins Shh 1314-SH/CF auf die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Gli1, Gli2 und Gli3

Die Transkriptionsfaktoren Gli1-3 sind Bestandteile des Hedgehog-Signalwegs und werden wiederum unter anderem im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus durch diesen reguliert. Sie befinden sich in der Signalkaskade downstream von Smo. Vor diesem Hintergrund wurde die Auswirkung einer Hemmung, beziehungsweise einer Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs durch den Smo-Inhibitor und Shh auf Gli1, Gli2 und Gli3 analysiert. Die jeweilige Expression wurde auf das Haushaltsgen Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Der verwendete Inhibitor wurde in hochdosierter Konzentration (1 µM) und das Shh in einer Konzentration von 5 nM eingesetzt. Die einer Nullkontrolle entsprechende DMSO-Kontrolle enthielt die gleiche Menge DMSO wie der Inhibitor. Die Gli-Expressionen der Zelllinien Kasumi-1, SKM-1 und U937 werden in den Abbildungen 9-11 dargestellt, wobei die jeweiligen DMSO-Kontrollen als Referenz 100% gleichgesetzt wurden.

Abbildung 9 fasst die Ergebnisse der relativen mRNA-Expression von Gli1-3 in den Kasumi-1-Zellen zusammen. Es sind keine einheitlichen Ergebnisse durch Stimulation mit dem Smo-Inhibitor und Shh auszumachen, da sich in der Wiederholung der Versuche teilweise entgegengesetzte Resultate ergaben.

Der Inhibitor führte in zwei von drei Analysen zu einer Steigerung der Gli1-Expression nach achtstündiger Stimulation (a). Währenddessen zeigte sich durch den Smo-Inhibitor nach 24-stündiger Stimulation zweimal eine sinkende Tendenz der Expressionsrate von Gli1 (b). Eine dritte Durchführung ergab keine Änderung in der Expression (a+b). Gli2 zeigte nur in einem der beiden Versuchsdurchgänge eine Expression. Durch den Inhibitor wurde keine Änderung der Expression erzielt. In der Gli3-Expression führte der Smo-Inhibitor, ebenso wie für Gli1 einmal zu einer Steigerung des Expressionslevels der kurzzeitig stimulierten Ansätze (e) und zu einer Reduktion der Expression auf die langzeitig stimulierten Ansätze (f), während die Veränderung in der zweiten Versuchsdurchführung als biologische Schwankungen zu werten sind.

Das Sonic Hedgehog-Protein verminderte die Gli1-Expression jeweils einmal nach acht Stunden und einmal nach 24 Stunden, während in den wiederholten Versuchen keine Unterschiede in der Expression verzeichnet werden konnten (a+b). Die Gli2-Expression wurde nach achtstündiger Inkubation ebenfalls gehemmt, während die 24-stündige Inkubation zu keiner Expressionsänderung führte (c+d). Gli3 zeigte sowohl einmal nach achtstündiger, als auch nach 24-stündiger Stimulation eine reduzierte Expression. In Versuch 1 ergaben sich für Gli3 keine Expressionsunterschiede (e+f).

Auch die simultane Einwirkung von Inhibitor und Hedgehog-Protein ergab heterogene Effekte. Bei zwei der drei Versuche kam es für Gli1 zu einer Herabregulierung der Expression nach acht Stunden, während ansonsten keine Änderung in der Gli-1-Expression beobachtet wurde (a+b). Für Gli2 ergab sich eine Reduktion in der Expressionsrate nach 24-stündiger Inkubation, während die Expression der

kurzzeitigen Stimulierung unverändert blieb (c+d). Die Wirkung der simultanen Behandlung bestand für Gli3 in einer reduzierten Expression für jeweils einen Versuch nach kurzzeitiger und langzeitiger Stimulation, während die Gli3-Expression in Versuch 2 unverändert blieb (e+f).

Insgesamt erwiesen sich die Effekte der einzelnen Substanzen als recht gering und da sich außer für Gli2, keine mittlere Expressionsänderung um den Faktor 2 oder höher zeigte, sehen wird die Veränderungen im Rahmen der natürlichen Schwankungen.

#### Kasumi-1



**Abbildung 9: Der Einfluss des Smo-Inhibitors und von Shh auf die Expression der Gli-Gene in den Kasumi-1-Zellen** Die Stimulation mit Inhibitor und Shh zeigte keinen einheitlichen Effekt auf die mRNA-Expression der Gli-Gene. Gli2 wurde nur in einem Versuchsdurchgang exprimiert. Die Gli1-Expression des Inh-Ansatzes nach achtstündiger Inkubation in Versuch 2 entspricht 325% und wird in der gewählten Skala nicht vollständig dargestellt (\*). Der DMSO-Ansatz enthält die gleiche Menge DMSO wie der 1 μM Inhibitor-Ansatz. Die Gli-Expression des DMSO-Ansatzes wurde auf 100% gesetzt. Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Gli1-3 = Glioma-assoziiertes Onkogen 1-3, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein. Tabelle 3 stellt eine Übersicht aus den Mittelwerten der mRNA-Expression der einzelnen Versuche sowie die Standardabweichungen dar. Eine detaillierte Darstellung der Tabelle mit den Einzelwerten folgt im Anhang.

| Ansatz  | Gli1 8h   | Gli1 24 h | Gli2 8h | Gli2 24h | Gli3 8h  | Gli3 24h |
|---------|-----------|-----------|---------|----------|----------|----------|
| DMSO    | 100 ±0,0  | 100 ±0,0  | 100     | 100      | 100 ±0,0 | 100 ±0,0 |
| Inh     | 196±118,9 | 82±47,2   | 86      | 137      | 129±27,9 | 75±20,4  |
| Shh     | 85±26,3   | 102±38,9  | 36      | 145      | 81±40,5  | 63±42,1  |
| Inh+Shh | 79±25,2   | 91±14,0   | 112     | 48       | 69±18,2  | 51±46,3  |

#### Tabelle 3: Relative mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Gli1-3 in den Kasumi-1-Zellen

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen sind in Prozent auf die Nullkontrolle normiert. Gli2 wurde in Versuch 2 nicht exprimiert, sodass für Gli2 nur Einzelwerte ohne Standardabweichungen existieren.

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Gli1-3 = Glioma-assoziiertes Onkogen 1-3, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

In Abbildung 10 sind die Resultate der Genexpression von Gli1-3 in Abhängigkeit des Einflusses des Smoothened-Inhibitors und von Shh für die Zelllinie SKM-1 zu sehen. Die Ergebnisse stellten sich sehr heterogen dar, sodass keine eindeutige Aussage bezüglich der Wirkung der jeweiligen Substanzen getroffen werden kann. Für Gli2 ist nur ein Versuchsdurchgang nach 24-stündiger Inkubation abgebildet und für Gli3 erfolgt keine graphische Darstellung der 24-stündigen Stimulierung, da die Ansätze hier nicht exprimiert wurden.

Die achtstündige Inkubation mit dem Inhibitor zeigte zweimal eine Steigerung in der Gli1-Expressionrate (a) und einmal eine Steigerung der Gli-1-Expression nach 24 Stunden (a+b), während in den weiteren Versuchsdurchgängen keine Änderung der Gli-1-Expression verzeichnet werden konnte. Nach acht Stunden kam es durch den Inhibitor in der ersten Versuchsdurchführung zu einer Stimulation der Gli2-Expression, in der zweiten Durchführung allerdings zu einer Reduktion in der Expression (c). Nach 24-stündiger Inkubation zeigte der Ansatz mit dem Inhibitor eine deutliche Steigerung in der Gli2-Genexpression (d). Die Expression von Gli3 nach achtstündiger Einwirkzeit stellte sich in Versuch 1 vermindert und in Versuch 2 unverändert dar (e).

Die Behandlung mit Shh führte zweimal zu einer Steigerung der Gli1-Expressionsrate nach acht Stunden, während in den übrigen Versuchen kein Effekt auf das Expressionslevel beobachtet werden konnte (a+b). Sowohl für Gli2 als auch für Gli3 zeigte sich jeweils einmal eine verminderte Expression nach achtstündiger Inkubation mit Shh, welche in der Wiederholung des Versuchs nicht bestätigt werden konnte (c+e). Die eintägige Inkubation mit Shh führte zu einer verstärkten Gli2-Expression (d).

Die kombinierte Behandlung mit dem Inhibitor und Shh führte sowohl nach acht als auch nach 24 Stunden zu einer Stimulation der Gli1-Genexpression (a+b). Für Gli2 zeigte sich sowohl eine verminderte als auch eine gesteigerte Expressionsrate nach achtstündiger Inkubation (c). Nach 24stündiger Einwirkzeit kam es zu einer Steigerung im Gli2-Expressionslevel (d). Gli3 zeigte nach kurzer Inkubation einmal eine Herabregulierung und einmal eine unveränderte Expression (e). Zusammenfassend ist keine eindeutige Aussage über den Effekt des Smoothened-Inhibitors und von Shh zu treffen, da sich der jeweilige Einfluss meist als sehr gering dargestellte, beziehungsweise im wiederholten Versuch nicht rekonstruiert werden konnte. Die dargestellten Veränderungen sehen wir am ehesten im Rahmen natürlicher Schwankungen.



#### SKM-1

0

DMSO

Inh

#### Abbildung 10: Der Einfluss des Smo-Inhibitors und von Shh auf die Expression der Gli-Gene in den SKM-1-Zellen

Inh+Shh

Shh

Die Stimulation mit dem Inhibitor und Shh zeigt keinen einheitlichen Effekt auf die mRNA-Expression der Gli-Gene. Gli2 wurde im zweiten Versuchsdurchgang nach 24-stündiger Inkubation nicht exprimiert. Gli3 zeigte nach 24-stündiger Stimulierung beide Male keine Expression. Die Gli1-Expression des Inh-Ansatzes nach acht Stunden in Versuch 2 entspricht 590% und kann dementsprechend, wie die Gli2-Expression des Inh-Ansatzes (2089%) und des Shh-Ansatzes (2538%) aus Versuch 1 in der gewählten Skala nicht vollständig dargestellt werden (\*).Der DMSO-Ansatz enthält die gleiche Menge DMSO wie der 1 µM Inhibitor-Ansatz. Die Gli-Expression des DMSO-Ansatzes wurde auf 100% gesetzt.

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Gli1-3 = Glioma-assoziiertes Onkogen 1-3, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.
Tabelle 4 zeigt eine Übersicht aus den Mittelwerten der mRNA-Expression der einzelnen Versuche sowie die Standardabweichungen. Eine ausführliche Darstellung der Tabelle mit den Einzelwerten folgt im Anhang.

| Ansatz  | Gli1 8h   | Gli1 24 h | Gli2 8h   | Gli2 24h | Gli3 8h  | Gli3 24h |
|---------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|
| DMSO    | 100 ±0,0  | 100 ±0,0  | 100 ±0,0  | 100      | 100 ±0,0 | Х        |
| Inh     | 314±241,4 | 159±106,5 | 122±72,2  | 2089     | 67±22,2  | Х        |
| Shh     | 189±70,5  | 100±30,0  | 82±92,3   | 2538     | 13±140,6 | Х        |
| Inh+Shh | 261±101,9 | 151±11,1  | 103±119,8 | 349      | 49±65,6  | Х        |

#### Tabelle 4: Relative mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Gli1-3 in den SKM-1-Zellen

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen sind in Prozent auf die Nullkontrolle normiert. Gli2 wurde im zweiten Versuch nach 24-stündiger Inkubation nicht exprimiert, sodass hier nur ein Einzelwert existiert. Gli3 wurde nach 24-stündiger Inkubation mit den jeweiligen Substanzen in beiden Versuchen nicht exprimiert. Aus diesem Grund befinden sich keine Werte in der Tabelle (X).

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Gli1-3 = Glioma-assoziiertes Onkogen 1-3, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

Abbildung 11 zeigt den Effekt des Smo-Inhibitors und von Shh auf die mRNA-Expression von Gli1 und Gli3 in der Zelllinie U937. Auch hier lassen sich, wie bei den anderen Zelllinien, sehr heterogene Ergebnisse verzeichnen. Gli2 zeigte in den U937-Zellen keine Expression.

Durch den Inhibitor kam es sowohl für Gli1, als auch für Gli3 in allen Versuchen nach achtstündiger Inkubation zu einer gesteigerten Expression (a+c). Nach 24-stündiger Stimulation kam es nur in jeweils einem Versuch zu einem Anstieg der Gli1- und Gli3-Expression, während zudem zweimal eine gehemmte Expression für Gli1 und einmal für Gli3 beobachtet werden konnte (b+d).

Shh führte zweimal zu einer gesteigerten und einmal zu einer verminderten Gli1-Expression nach kurzzeitiger Stimulation (a). Nach 24-stündiger Inkubation kam es einmal zu einer Herabregulierung, einmal zu einer Steigerung und einmal zu keiner Veränderung der Gli1-Expression (b). Für Gli3 zeigte sich durch achtstündige Stimulation eine vermehrte Expression und nach 24 Stunden jeweils einmal eine Steigerung und einmal eine Hemmung der Expression (c+d).

Die simultane Inkubation wiederum ergab für zwei Versuchsdurchführungen nach acht Stunden eine gesteigerte und einmal eine gehemmte Expressionsrate von Gli1 sowie nach 24 Stunden einmal eine gehemmte, einmal eine gesteigerte und einmal eine unveränderte Expression (a+b). Die Gli3-Expression wurde nach acht Stunden durch die kombinierte Stimulation vermindert, während sie nach 24 Stunden in einem Versuchsdurchgang zu einer vermehrten Expression und in dem anderen zu einer unveränderten Expression führte (c+d).

Zusammenfassend lassen sich allerdings auch bei der U937-Zelllinie keine einheitlichen und aussagekräftigen Effekte zwischen den verschiedenen Ansätzen ausmachen.



U937

Abbildung 11: Der Einfluss des Smo-Inhibitors und von Shh auf die Expression der Gli-Gene in der U937-Zelllinie Die Stimulation mit dem Smo-Inhibitor und Shh zeigt keinen einheitlichen Effekt auf die mRNA-Expression der Gli-Gene. Gli2 zeigte in beiden Versuchsdurchgängen keine Expression. Die Gli1-Expression des Inh-Ansatzes nach acht Stunden in Versuch 1 entspricht 1235% und kann dementsprechend in der gewählten Skala nicht vollständig dargestellt werden (\*). Der DMSO-Ansatz enthält die gleiche Menge DMSO wie der 1 µM Inhibitor-Ansatz. Die Gli-Expression des DMSO-Ansatzes wurde auf 100% gesetzt.

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Gli1-3 = Glioma-assoziiertes Onkogen 1-3, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

Tabelle 5 zeigt eine Übersicht aus den Mittelwerten der mRNA-Expression der einzelnen Versuche sowie die Standardabweichungen. Eine ausführliche Darstellung mit den Einzelwerten folgt im Anhang.

| Ansatz  | Gli1 8h   | Gli1 24 h | Gli2 8h | Gli2 24h | Gli3 8h   | Gli3 24h  |
|---------|-----------|-----------|---------|----------|-----------|-----------|
| DMSO    | 100 ±0,0  | 100 ±0,0  | Х       | Х        | 100 ±0,0  | 100 ±0,0  |
| Inh     | 550±592,9 | 132±127,9 | Х       | Х        | 230±30,05 | 131±109,9 |
| Shh     | 228±186,3 | 175±169,8 | Х       | Х        | 278±46,2  | 197±228,3 |
| Inh+Shh | 200±133,0 | 176±178,1 | Х       | Х        | 43±29,3   | 244±193,0 |

#### Tabelle 5: Relative mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Gli1-3 in den U937-Zellen

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen sind in Prozent auf die Nullkontrolle normiert. Gli2 zeigte in beiden Versuchsdurchführungen keine Expression (X).

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Gli1-3 = Glioma-assoziiertes Onkogen 1-3, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

### 4.5.2 Auswirkungen des Smoothened-Inhibitors PF-04449913 und des Hedgehog-Proteins Shh 1314-SH/CF auf die Expression verschiedener Stammzellgene

Analysiert wurde im Weiteren die mRNA-Expression bestimmter Stammzellgene nach Hemmung, beziehungsweise Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs. Hierzu wurden die Stammzellgene LKB-1, KLF4, NANOG, POU5F1, PRDM14 und SOX2, welche außerdem Transkriptionsfaktoren darstellen, untersucht. Stammzellgene besitzen die Fähigkeit, Zellen in sogenannte "induzierte pluripotente Stammzellen" zu überführen, beziehungsweise die Pluripotenz von Stammzellen zu erhalten. (Chambers et al. 2003, Loh et al. 2006, Takahashi und Yamanaka 2006, Okita et al. 2007).

Vor diesem Hintergrund wurde der Zusammenhang zwischen den Stammzellgenen und dem Hedgehog-Signalweg mittels quantitativer PCR-Analyse untersucht. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen wurden gegen das Haushaltsgen GAPDH normalisiert. Nicht für alle Stammzellgene konnte durch die quantitative PCR eine Expression nachgewiesen werden, sodass einige im Folgenden nicht graphisch dargestellt werden. Die Ergebnisse für die restlichen Stammzellgene sind in den Abbildungen 12-14 für die jeweiligen Zelllinien dargestellt. Eine aussagekräftige Veränderung in der jeweiligen Expression der verschiedenen Stammzellgene ist weder durch Stimulation mit dem Smoothened-Inhibitor, noch mit dem Hedgehog-Protein ersichtlich. Dies gilt gleichermaßen für alle drei Zelllinien und sowohl für die Ansätze der achtstündigen, als auch für die der 24-stündigen Stimulation.

Abbildung 12 stellt die mRNA-Expression der Stammzellgene in den Kasumi-1-Zellen dar. In Zusammenschau lässt sich ein Effekt auf die Expression der untersuchten Stammzellgene weder für den Inhibitor noch für das Hedgehog-Protein nachweisen. Da sich in keinem Fall eine mittlere Expressionsänderung um der Faktor 2 oder höher zeigte, sehen wir die geringfügigen Veränderungen im Rahmen der natürlichen Schwankung. Die Resultate für PRDM14 und SOX2 sind weder graphisch, noch in der Tabelle dargestellt, da in der quantitativen PCR keine Expression nachgewiesen werden konnte. Dies gilt auch für das Ergebnis für das Stammzellgen KLF4 aus Versuch 1, welches nach Zugabe des Smoothened-Inhibitors keine Expression zeigte und somit graphisch nicht dargestellt ist.



b.) KLF4 (24h)

**Kasumi-1** a.) KLF4 (8h)

Abbildung 12: Der Einfluss des Smo-Inhibitors und von Shh auf die Stammzellgen-Expression in den Kasumi-1-Zellen Für KLF4 (24 h) konnte in Versuch 1 keine Expression nachgewiesen werden. Der DMSO-Ansatz enthält die gleiche Menge DMSO wie der 1  $\mu$ M Inh-Ansatz. Die mRNA-Expression im DMSO-Ansatz wurde auf 100% gesetzt. Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

36

| Ansatz  | KLF4 8h  | KLF4 24 h | LKB 8h   | LKB 24h  | NANOG 8h | NANOG 24h | POU5F1 8h | POU5F1 24h |
|---------|----------|-----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|------------|
| DMSO    | 100 ±0,0 | 100 ±0,0  | 100 ±0,0 | 100 ±0,0 | 100 ±0,0 | 100 ±0,0  | 100 ±0,0  | 100 ±0,0   |
| Inh     | 101±7,4  | 103       | 101±1,0  | 99±3,6   | 100±3,2  | 99±0,2    | 104±1,2   | 101±2,9    |
| Shh     | 92±2,4   | 102±5,6   | 99±0,4   | 99±0,9   | 97±2,3   | 97±3,8    | 101±1,3   | 93±4,5     |
| Inh+Shh | 96±0,2   | 94±5,7    | 98±0,1   | 99±0,1   | 97±2,2   | 95±4,3    | 95±6,6    | 94±4,0     |

Tabelle 6 zeigt eine Übersicht aus den Mittelwerten der mRNA-Expression der einzelnen Versuche sowie die Standardabweichungen. Eine detaillierte Tabelle mit den Einzelwerten folgt im Anhang.

Tabelle 6: Relative mRNA-Expression der Stammzellgene in den Kasumi-1-Zellen

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen sind in Prozent auf die Nullkontrolle normiert. In dem Versuch mit KLF4 unter 24-stündiger Inkubation kam es für die Probe mit Zugabe des Inhibitors in Versuch 1 zu keiner Expression. Folglich ist in der Tabelle nur ein Wert ohne Standardabweichung eingetragen.

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

Abbildung 13 zeigt die mRNA-Expression der Stammzellgene in den SKM-1-Zellen. Es wird deutlich, dass eine Stimulation der verschiedenen Stammzellgene mit dem Inhibitor, dem Hedgehog-Protein, beziehungsweise einer simultanen Stimulation aus beiden Substanzen kaum einen Effekt auf die Expression der Stammzellgene ausübt. Es zeigt sich keine Expressionssteigerung oder –hemmung um den Faktor 2 oder höher, sodass wir die geringen Veränderungen im Rahmen der natürlichen Schwankung sehen. Für die Stammzellgene SOX2 und PRDM14 konnte keine Expression nachgewiesen werden.

#### SKM-1



b.) KLF4 (24h)







 120
 Versuch 1

 Versuch 2
 0

 60
 0

 20
 0

 DMSO
 Inh

 Shh
 Inh+Shh

#### e.) NANOG (8h)

G) POU5F1 (8h)



f.) NANOG (24h)



h.) POU5F1 (24h)



elativ

Abbildung 13: Der Einfluss des Smo-Inhibitors und von Shh auf die Stammzellgen-Expression in den SKM-1-Zellen Aufgrund fehlender Expression sind die Gene PRDM14 und SOX2 graphisch nicht dargestellt. Der DMSO-Ansatz enthält die gleiche Menge DMSO wie der 1 µM Inh-Ansatz. Die mRNA-Expression im DMSO-Ansatz wurde auf 100% gesetzt. Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein. Tabelle 7 veranschaulicht eine Übersicht aus den Mittelwerten der mRNA-Expression der einzelnen Versuche sowie die Standardabweichungen. Eine ausführliche Tabelle mit den Einzelwerten folgt im Anhang.

|         | KLF4 8h  | KLF4 24 h | LKB 8h   | LKB 24h  | NANOG 8h | NANOG 24h | POU5F1 8h | POU5F1 24h |
|---------|----------|-----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|------------|
| DMSO    | 100 ±0,0 | 100 ±0,0  | 100 ±0,0 | 100 ±0,0 | 100 ±0,0 | 100 ±0,0  | 100 ±0,0  | 100 ±0,0   |
| Inh     | 98±3,1   | 103±0,8   | 102± 3,6 | 104 ±3,5 | 96±3,7   | 102±10,6  | 97±4,1    | 101±6,8    |
| Shh     | 99±0,1   | 91±9,9    | 103 ±1,1 | 91 ±7,6  | 101±2,2  | 90±14,1   | 99±0,1    | 91±11,6    |
| Inh+Shh | 99±4,9   | 95±11,0   | 105 ±0,1 | 97 ±9,9  | 103±8,4  | 97±16,6   | 101±4,3   | 96±13,6    |

Tabelle 7: Relative mRNA-Expression der Stammzellgene in den SKM-1-Zellen

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen sind in Prozent auf die Nullkontrolle normiert. Aufgrund fehlender Expression sind die Werte für PRDM14 und SOX2 tabellarisch nicht dargestellt.

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

Abbildung 14 stellt die mRNA-Expression der Stammzellgene in den U937-Zellen dar. Es bestehen lediglich sehr geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen. Sowohl das Stammzellgen SOX2 mit Stimulation über 24 Stunden, als auch PRDM14 sind graphisch nicht dargestellt, da für diese keine Expression nachgewiesen werden konnte. Insgesamt lässt sich keine Änderung der mittleren Expression um der Faktor 2 oder höher zeigte. So sind die geringfügigen Veränderungen im Rahmen der natürlichen Schwankung zu sehen.

### U937



b.) KLF4 (24h)







d.) LKB-1 (24h)



e.) NANOG (8h)



f.) NANOG (24h)







### h.) POU5F1 (24h)





Abbildung 14: Der Einfluss des Smo-Inhibitors und von Shh auf die Stammzellgen-Expression in den U937-Zellen Eine Expression für SOX2 nach 24-stündiger Inkubation in Versuch 2 und für PRDM14 konnte nicht nachgewiesen werden, sodass für diese Stammzellgene keine graphische Darstellung erfolgt. Der DMSO-Ansatz enthält die gleiche Menge DMSO wie der 1 µM Inh-Ansatz. Die mRNA-Expression im DMSO-Ansatz wurde auf 100% gesetzt

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

Tabelle 8 fasst eine Übersicht aus den Mittelwerten der mRNA-Expression der einzelnen Versuche sowie die Standardabweichungen zusammen. Eine ausführliche Tabelle mit den Einzelwerten folgt im Anhang.

| Ansatz  | KLF4 8h | KLF4 24 h | LKB1 8h | LKB1 24h | NANOG 8h | NANOG 24h | POU5F1 8h | POU5F1 24h |
|---------|---------|-----------|---------|----------|----------|-----------|-----------|------------|
| DMSO    | 100±0,0 | 100±0,0   | 100±0,0 | 100±0,0  | 100±0,0  | 100±0,0   | 100±0,0   | 100 ±0,0   |
| Inh     | 95±4,6  | 99±2,1    | 98±1,8  | 99±3,9   | 93±14,2  | 99±3,4    | 93±11,6   | 101±1,4    |
| Shh     | 93±4,3  | 100±0,8   | 98±2,4  | 102±0,2  | 94±6,5   | 101±3,6   | 93±5,0    | 102±2,3    |
| Inh+Shh | 101±1,0 | 100±2,9   | 100±2,1 | 101±2,8  | 104±61   | 97±2,9    | 105±8,8   | 100±2,5    |

| Ansatz  | SOX2 8h | SOX2 24 h |
|---------|---------|-----------|
| DMSO    | 100±0,0 | 100       |
| Inh     | 85±18,6 | 100       |
| Shh     | 92±2,7  | 97        |
| Inh+Shh | 100±3,0 | 95        |

#### Tabelle 8: Relative mRNA-Expression der Stammzellgene in U937-Zellen

Die Mittelwerte und die Standardabweichungen sind in Prozent auf die Nullkontrolle normiert. Aufgrund fehlender Expression sind die Werte für PRDM14 nicht dargestellt. Das Stammzellgen SOX2 wurde in Versuch 2 nicht exprimiert. Folglich ist in der Tabelle der Einzelwert ohne Standardabweichung vorhanden.

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

### 5 Diskussion

Die akute myeloische Leukämie ist eine hämatologische Erkrankung, die ohne adäquate und sofortige Behandlung schnell zum Tode führt. Die aktuelle Therapie hat sich seit mehreren Jahren kaum verändert, sodass sich auch die Prognose dieser Tumorerkrankung wenig verbessert hat. Dies hängt vor allem damit zusammen, dass die AML eine sehr heterogene Erkrankung darstellt und ihr viele verschiedene Auslöser, beziehungsweise genetische Ursachen zu Grunde liegen. Diese wiederum stellen jedoch die Möglichkeit dar, spezifisch in die jeweilige Entstehung einzugreifen und somit die Behandlungsoptionen zu erweitern und zu verbessern. Die herkömmliche Therapie, bestehend aus einer Induktionschemotherapie und der darauf folgenden Postremissionstherapie, könnte entsprechend der Ursache der AML spezifisch ergänzt werden. Des Weiteren stellt die relativ hohe Rezidivrate ein weitreichendes Problem dar. Auch diesbezüglich erhofft man sich durch weitere Forschung und neue Therapiemöglichkeiten bessere Heilungsoptionen. Mit diesen Ansatzpunkten beschäftigten sich in den letzten Jahren viele verschiedene Forschungsgruppen, um eine verbesserte Therapie zu entwickeln und somit eine bessere Prognose für Patienten mit einer AML zu erreichen.

Der Hedgehog-Signalweg hat vor allem in der Embryonalentwicklung einen wichtigen Stellenwert, ist aber auch im adulten Organismus weiter von Bedeutung, indem er in das Verhalten von Stammzellen eingreifen kann (Stecca und Ruiz i Altaba 2010, Irvine und Copland 2012). Neben diesen Aufgaben konnte dem Hedgehog-Signalweg auch eine Bedeutung in der Tumorentwicklung verschiedener Tumorentitäten zugeteilt werden. Typische Vertreter hierfür stellen das Basalzellkarzinom und das Medulloblastom dar (Corey *et al.* 1997, Li *et al.* 2011). Auch ist eine Hemmung dieser Signalkaskade durch den Smoothened-Inhibitor GDC-0449 seit 2012 für die Behandlung von fortgeschrittenen Basalzellkarzinomen zugelassen (Cirrone und Harris 2012). Zudem scheint der Hedgehog-Signalweg eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und somit auch in hämatologischen Neoplasien zu spielen (Cridland *et al.* 2009).

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich ein Eingreifen in den Hedgehog-Signalweg auf das Verhalten verschiedener AML-Zelllinien auswirkt. Um den Signalweg zu inhibieren wurde der Hemmstoff PF-04449913 verwendet, welcher den Smoothened-Rezeptor inhibiert. Insbesondere wurde die Wirkung der Smo-Inhibierung durch PF-04449913 und die Stimulation des Hedgehog-Signalwegs durch das Hedgehog-Protein Shh 1314-SH/CF auf die AML-Zelllinien mittels Proliferations-Assays, Colony-Formations-Assays und quantitativen PCR-Analysen untersucht. Entgegengesetzt zu einigen Ergebnissen anderer Forschungsgruppen sowohl mit demselben Inhibitor, als auch mit anderen Smo-Inhibitoren konnte in den hier durchgeführten Versuchen kein Effekt durch PF-04449913 nachgewiesen werden. Die Kurzzeitproliferationsrate, sodass im Anschluss eine Langzeitproliferation durchgeführt wurde. Hiermit sollte untersucht werden, ob *in vitro* eine längere Inkubationszeit des Inhibitors benötigt wird, um die erwartete proliferationshemmende Wirkung zu erzielen. Die einzelnen Ansätze wurden für eine Dauer von 14 Tagen alle drei bis vier Tage erneut mit Smo-Inhibitor und zusätzlich mit dem Hedgehog-Protein Shh stimuliert. Der Versuch wurde mit zwei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (1 μM und 0,1 μM) durchgeführt.

Überraschenderweise konnte auch während der Langzeitproliferation weder ein proliferationshemmender Effekt durch PF-04449913, noch ein proliferationsstimulierender Effekt durch Shh ermittelt werden. Zur weiteren Spezifizierung der potenziell antileukämischen Wirkung von PF-04449913 wurde die Colony-Formations-Kapazität der drei AML-Zelllinien unter dem Einfluss des Smo-Inhibitors untersucht. Weder durch PF-04449913, noch durch das Hedgehog-Protein Shh konnte eine Veränderung in der Koloniebildung beobachtet werden. Mittels quantitativer Real-Time-PCR-Analysen wurde weiter die Expression der Gene Gli1-3 in den AML-Zelllinien untersucht. Passend zu den Ergebnissen in den Proliferations-Assays und den Colony-Assays konnte auch hier weder durch die Stimulation mit PF-04449913 noch Shh eine Veränderung in der Expression der Gene gezeigt werden. Diese Resultate bekräftigen einen fehlenden Effekt des Inhibitors und von Shh auf den Hedgehog-Signalweg in den durchgeführten in vitro Versuchen. In der Expression der Gli-Gene zeigten sich teilweise relevante Unterschiede in den einzelnen Versuchsreihen, die jedoch in den Wiederholungen nicht reproduzierbar waren. In weiteren PCR-Analysen wurde der Zusammenhang der Stammzellgene KLF4, LKB-1, NANOG, POU5F1, PRDM14 und SOX2 mit dem Hedgehog-Signalweg untersucht. NANOG, POU5F1 und SOX2 bilden ein sogenanntes "Kernnetzwerk", beziehungsweise eine "Signatur" in embryonalen Stammzellen (Boyer et al. 2005). Des Weiteren ist NANOG zum Beispiel zur Ausbildung der Pluripotenz und der Selbsterneuerungsfähigkeit und damit für die Kontinuität von Stammzellen essenziell. Zudem wurden einige der untersuchten stammzelltypischen Gene auch in verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen. Für NANOG wurde außerdem ein Zusammenhang mit dem Hedgehog-Signaltransduktionsweg beobachtet. So konnte die Forschungsgruppe von Zbinden et al. demonstrieren, dass eine gesteigerter Gli1-Funktion zu einer vermehrten Selbsterneuerung neuraler Stammzellen transgener Mäuse sowie zu einer verstärkten Expression von NANOG führte. In vivo-Versuche ergaben weiter eine Abhängigkeit des Stammzellgens NANOG von einem funktionsfähigen Hedgehog-Signalweg, wie auch die Notwendigkeit von NANOG für das Wachstum eines Glioblastoms (Zbinden et al. 2010). Prasad et al. konnten eine Überexpression der Stammzellgene KLF4 und SOX-2 in intraepithelialen Neoplasien des Pankreas (PanINs) beobachten und konnten so das Vorkommen von Stammzellgenen in Tumoren aufzeigen. PanINs stellen Vorstufen eines Pankreaskarzinoms dar. Sowohl KLF-4 als auch SOX-2 lassen sich in normalem Pankreasgewebe nicht oder nur gering nachweisen lassen. Ein weiterer Zusammenhang mit dem Hedgehog-Signalweg konnte durch Gli1-transfizierte humane pankreatische duktale epitheliale (HPDE)-Zellen hergestellt werden, welche ebenfalls eine Überexpression von SOX2 und KLF4 zeigten (Prasad et al. 2005). In unseren Versuchen wurden die Stammzellgene KLF4, LKB-1, POU5F1 und NANOG in allen drei untersuchten Zelllinien exprimiert. Hingegen konnte PRDM14 in keiner Zelllinie nachgewiesen werden. Für SOX2 unterschieden sich die Ergebnisse in den einzelnen Zelllinien. Eine Expression konnte lediglich in der Zelllinie U937 beobachtet werden. Insgesamt zeigten sich die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen sehr homogen und ohne Anhalt für einen Einfluss des Smo-Inhibitors PF-04449913, beziehungsweise des Hedgehog-Proteins Shh. Die sehr geringen Abweichungen in den Resultaten können am ehesten als physiologische Schwankungen betrachtet werden.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit mit unseren *in vitro*-Versuchen keinen Effekt durch die Smo-Inhibierung mit PF-04449913 erzielen. Im Gegensatz hierzu wiesen allerdings andere Forschungsgruppen die Wirksamkeit unterschiedlicher Smo-Inhibitoren in verschiedenen Tumorentitäten nach, die zum Teil auch auf Ebene der Genexpression gezeigt werden konnte. Einen wichtigen Faktor für den Erfolg einer Smo-Inhibierung scheinen Stromazellen zu spielen. In Versuchen mit einer Kokultivierung durch Stromazellen, beziehungsweise durch Verwendung von primären Zellkulturen, die im Gegensatz zu unseren Zelllinien, nicht frei von Stromazellen sind, wurde insgesamt ein besseres Ansprechen auf den Inhibitor beobachtet. Garrido *et al.* konnten 2001 zeigen, dass eine Kokultivierung von AML-Zelllinien, beziehungsweise primären AML-Zellen mit Stromazellen zu einem verminderten Zelltod unter Kultivierungsbedingungen und unter Chemotherapiewirkung führte. Des Weiteren kam es im Vergleich zu Zellen ohne Kokultivierung zu einer erhöhten Proliferationsrate und einer vermehrten Koloniebildung. Durch eine Kokultivierung wird eine *in vitro*-Forschung ermöglicht, bei der die Untersuchungsbedingungen den *in vivo*-Bedingungen angeglichen sind (Garrido *et al.* 2001).

Die meisten veröffentlichten Daten zur Smo-Inhibierung bestehen für den natürlichen Inhibitor Cyclopamin. In verschiedenen soliden Tumoren konnte mittels Cyclopamin eine Hemmung der Proliferation von gastrointestinalen Tumorzellen (Bermann et al. 2003) sowie von Brustkrebs- (Kubo et al. 2004) und Eierstockkrebszellen (Chen et al. 2007) erreicht werden. Außerdem wurde in vitro eine signifikante Hemmung des Wachstums von murinen Pankreastumorzelllinien nach Einsatz von Cyclopamin beobachtet (Feldmann et al. 2008b). Sanchez et al. konnten für verschiedene Prostatatumorzelllinien (LNCaP, PC3 und DU145) und primären Prostatatumorzellkulturen eine Hemmung der Proliferation mittels Cyclopamin erreichen. Zusätzlich untersuchten sie den Einfluss von exogen zugeführtem Shh. In zwei von vier primären Prostatatumorzellkulturen zeigte sich durch das Hedgehog-Protein Shh eine Zunahme im Wachstum der Zellen, während es durch einen Shh-Antikörper in drei der vier primären Zellkulturen zu einer Hemmung der Proliferation kam. Diese Effekte konnten allerdings nur in den primären Zellen und nicht in den Prostatatumorzelllinien nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Zelllinien befanden sich in den primären Kulturen, wenn auch gering konzentriert, Stromazellen. Weiter führte eine Gli1-Hemmung durch RNA-Interferenz wiederum in allen drei Zelllinien zu einer Reduktion in den Proliferations-Assays, sodass die Ergebnisse insgesamt für einen aktivierten Hedgehog-Signalweg in Prostatatumoren sprechen (Sanchez et al. 2004). Kawahara et al. untersuchten den Einfluss von Cyclopamin auf verschiedene AML-Zellen. In den drei Zelllinien HL60, K562 und TMD7 kam es zu einer signifikanten Verminderung des Zellwachstums, während die Ergebnisse für die Zelllinie NB4 keine positive Wirkung des Inhibitors zeigte. In einer weiteren Zelllinie, HEL, konnten sie ebenfalls eine Hemmung der Proliferation durch Cyclopamin nachweisen, allerdings stellte diese sich nicht als signifikant dar (Kawahara et al. 2009). Bislang existieren nur wenig veröffentlichte Forschungsresultate über das Proliferationsverhalten von AML-Zellen unter der Wirkung von PF-04449913. Guadagnulo et al. konnten in in vitro-Versuchen keinen proliferationshemmenden Effekt von PF-04449913 nachweisen. Sie verwendeten den Inhibitor in Konzentrationen von 10 nM-100 M und untersuchten die Zellviabilität einen Tag, zwei Tage und drei Tage nach Zugabe des Inhibitors in den Zelllinien Kasumi-1, MOLM-13, HL60, KG1 und BV-M

(Guadagnuolo *et al.* 2012). Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Resultaten bezüglich des fehlenden Effekts auf die Proliferation von AML-Zellen durch PF-04449913 überein. Dem entgegengesetzt stehen die Ergebnisse von Fukushima *et al.*, die *ex vivo* eine durch PF-04449913 ausgelöste inhibierte Proliferation in AML-Zelllinien und primären AML-Zellen nachweisen konnten (Fukushima *et al.* 2013). Diese unterschiedlichen Versuchsergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass Fukushima *et al.* mit einer Kokultur aus HS-5-Stromazellen gearbeitet haben, welche eine humane Knochenmarkstromazellinie vom Fibroblasttyp darstellen.

Eine antileukämische Wirkung von Cyclopamin in Bezug auf die Fähigkeit der Koloniebildung konnten Kawahara et al. beobachten, als sie bei Anwendung von Cyclopamin eine signifikante Hemmung der Kolonien-Formation in einigen AML-Zelllinien und B-Zell-Leukämiezellen verzeichnen konnten (Kawahara et al. 2009). Diese Erkenntnisse konnten durch die Forschungsergebnisse von Dierks et al. unterstützt werden. Jene konnten eine reduzierte Koloniebildung von BCR-ABL-positiven CML-Zellen detektieren, nachdem die Zellen mit Cyclopamin behandelt wurden (Dierks et al. 2008). Ein weiterer Smo-Inhibitor, GDC-0449, führte in verschiedenen BCR-ABL-positiven Zelllinien ebenfalls zu einer verminderten Koloniebildung (Katagiri et al. 2013). Mit den oben zitierten Arbeiten lässt sich eine Hemmung durch Smo-Inhibitoren in der Koloniebildung vermuten, die in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte. In allen erwähnten Studien wurden die jeweiligen Zellen 72 Stunden lang mit dem entsprechenden Smo-Inhibitor inkubiert und die Kolonien nach sieben bis 14 Tagen ausgezählt. Unterschiede in den Versuchsdurchführungen oben erwähnter Forschungsgruppen scheint es vor allem in den verwendeten Colony-Assay-Medien zu geben. In der vorliegenden Arbeit wurde das Medium H4230 verwendet, welches weder Zytokine noch Erythropoietin (EPO) enthält. Im Gegensatz hierzu arbeiteten Katagiri et al. mit dem Medium H4433 und Dierks et al. mit H4435, welche beide sowohl Kolonien-stimulierende Faktoren, als auch EPO enthalten. Über das verwendete Medium in der Versuchsreihe von Kawahara et al. sind leider keine Informationen ersichtlich. Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen den Versuchen von Dierks et al. und Katagiri et al. stellt die Art der verwendeten Zelllinien dar, da beide Forschungsarbeiten auf BCR-ABL-positiven Zelllinien basieren.

Bisher bestehen für PF-04449913 wenig veröffentlichte Daten bezüglich der Genexpression der Hedgehog-Zielgene. Jackson-Fisher *et al.* gelang es im Rahmen von PCR-Analysen in mit PF-04449913 behandelten Medulloblastom-Allotransplantaten eine erniedrigte Gli1-Expression nachzuweisen (Jackson-Fisher *et al.* 2011). Guadagnuolo *et al.* konnten außerdem 2012 *ex vivo* in CD34<sup>+</sup>-Zellen von Patienten mit AML, CML oder MF eine Herunterregulation von Gli1 und Smo sowie eine Hochregulation von Gli2 durch PF-04449913 beobachten (Guadagnuolo *et al.* 2012). Eine verminderte Gli1-Expression konnten auch Schairer *et al. in vitro* in humanen CML-Zellen in der Blastenkrise bei Behandlung mit PF-04449913 erreichen (Schairer *et al.* 2010). Leider existieren keine veröffentlichen Daten über einen ausbleibenden Effekt des Inhibitors PF-04449913 auf Ebene der Genexpression. Für andere Smo-Inhibitoren als PF-04449913 besteht eine größere Anzahl präklinischer Arbeiten auf Expressionsebene, insbesondere im Rahmen der Erforschung solider Tumoren. So konnten zum Beispiel Feldmann *et al.* eine Herabregulierung in der Expression der Hedgehog-Zielgene Gli1 und Ptch durch den natürlichen Smo-Inhibitor Cyclopamin in drei

verschiedenen murinen Pankreastumorzelllinien beobachten (Feldmann et al. 2008b). Im selben Jahr untersuchten sie die Wirkung eines weiteren Smo-Inhibitors, IPI-269609, und konnten durch diesen ebenfalls eine Herunterregulation von Gli1 auf mRNA-Ebene in Pankreastumorstammzelllinien (E3LZ10.7 und Capan-1) erreichen (Feldmann et al. 2008a). Karlou et al. untersuchten die Bedeutung des Hedgehog-Signalwegs in CB17 SCID Mäusen, denen die humanen Prostatatumorzellen MDA PCa 118b implantiert wurden. Mittels qRT-PCR-Analyse wurde das Stroma gesunder Mäuse sowie das der Mäuse mit implantierten Prostatakrebszellen auf die Expression von Smo, Gli1 und Ptch untersucht. Diese Komponenten waren in dem Stroma unbehandelter Mäuse im Vergleich zu den erkrankten Mäusen signifikant erniedrigt, beziehungsweise nicht nachweisbar. Des Weiteren wiesen die xenotransplantierten Mäuse eine deutlich höhere Konzentration von Shh in den Tumorepithelzellen auf als im umliegenden Stroma auf, während sich die Expression von Gli1 umgekehrt dazu verhielt. So konnte eine Gli1-Überexpression innerhalb des Stromas im Vergleich zu den Tumorzellen selbst detektiert werden. Weiter wurde der Effekt des Smo-Inhibitors GDC-0449 untersucht. Die Expression von Gli1, Gli2, Shh und Ptch im Stroma der mit dem Inhibitor behandelten Mäuse war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle leicht erniedrigt. Eine Androgen-unabhängige Prostatatumor-Zelllinie PC3 wurde ebenfalls mit GDC-0449 behandelt um anschließend die Expression verschiedener Hedgehog-Zielgene zu bestimmen. Hier ergab sich eine deutlich verminderte Expression von Smo und Ptch durch die Hemmung des Hedgehog-Signalwegs (Karlou et al. 2012).

Zusammenfassend lassen sich die bisherigen Forschungsergebnisse bezüglich der Expression der Hedgehog-Zielgene durch eine Signalweghemmung heterogen darstellen. Dies bedeutet, dass die Daten sowohl auf verschiedenen Tumorentitäten als auch auf der Verwendung unterschiedlicher Inhibitoren basieren. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde gehäuft eine Herunterregulation in der Zielgen-Expression beobachtet. Insbesondere die Versuche von Karlou *et al.* lassen jedoch auf eine wichtige Bedeutung der den Tumor umgebenden Stromazellen schließen. Die unterschiedlichen Ergebnisse in den Versuchen mit dem Smo-Inhibitor PF-04449913 können sich zum Beispiel auch durch unterschiedliche Methoden erklären lassen. So führte Jackson-Fisher *et al.* die Versuche an Medulloblastom-Allotransplantaten durch und auch Guadagnuolo *et al.* verwendeten keine Tumorzelllinien, sondern führten *ex vivo* eine Behandlung von Leukämiezellen mit dem Smo-Inhibitor durch. Auch Schairer *et al.* verwendeten für ihre Untersuchungen primäre Leukämiezellen von lediglich drei Patienten. Diese Versuchsansätze beinhalten somit unterschiedliche Grundbedingungen für die Zellen und sind folglich nicht eindeutig mit *in vitro*-Versuchen zu vergleichen.

Während die *in vitro*-Versuche dieser Arbeit keinen Effekt für PF-04449913 zeigen konnten, wurde der Smo-Inhibitor für hämatologische Erkrankungen bereits in Phase-I- und Phase-II-Studien positiv getestet. So konnten unter anderem reduzierte Blastenzahlen und sogar einmal eine komplette Remission erreicht werden (Jamieson *et al.* 2011). Diese Resultate sprechen dem Hedgehog-Signalweg eine wichtige Bedeutung in der Tumorentwicklung zu. Auch gerade deshalb stellt sich die Frage, weshalb der Inhibitor in den präklinischen Versuchen so selten einen Einfluss hatte. Die bislang zu diesem Thema veröffentlichten Daten weisen eine höhere Effektivität der Inhibitoren in *in vivo*- und

*ex vivo*-Versuchen auf als bei *in vitro*-Versuchen. Diese sowie auch klinische Versuchsreihen zeigen eine deutlich höhere Komplexität und beinhalten Wechselwirkungen von mulitplen intrinsischen Faktoren, welche in *in vitro*-Versuchen nicht simuliert werden können.

Eine weitere Erklärung für den ausbleibenden Effekt in den Versuchen dieser Arbeit ist, dass bestimmte Stromazellen einen wichtigen Bestandteil für den Hedgehog-Signalweg darstellen könnten. Dies sollte vor allem auch deshalb Berücksichtigung finden, da in der Vergangenheit bereits über das wahrscheinliche Vorhandensein drei verschiedener Modelle des Hedgehog-Signalwegs in Tumorerkrankungen berichtet wurde. Das Modell I stellt ein ligandenunabhängiges Modell dar. Eine Stimulierung des Signalwegs wird hierbei nicht durch ein Hedgehog-Protein, sondern durch eine aktivierende, beziehungsweise hemmende Mutation zum Beispiel in den Rezeptoren Patched oder Smoothened ausgelöst. Dem Modell II liegt ein autokriner Mechanismus zu Grunde. Die Tumorzellen sezernieren dementsprechend das Hedgehog-Protein, welches wiederum auf sie selbst rückwirkt und so der Hedgehog-Signalweg in den Tumorzellen aktiviert wird. Das Modell III wird auch als parakrines Modell bezeichnet. Hier werden die Hedgehog-Proteine ebenfalls von den Tumorzellen sezerniert. Das Hedgehog-Protein wirkt jedoch nicht auf die Tumorzellen selbst, sondern auf die sich in der Mikroumgebung des Tumors befindenden Stromazellen. In diesen wird der Hedgehog-Signalweg aktiviert, wodurch die Stromazellen, am ehesten durch weitere Signalmoleküle, wiederum aktivierend auf die Tumorzellen zurückwirken und so zu einer Stimulation des Wachstums oder zu einem verminderten Zelltod der Krebszellen führen können. Eine Unterform des dritten Modells stellt die "reverse parakrine" Form dar, bei der das Hedgehog-Protein von den Stromazellen freigesetzt wird, welches dann von den Tumorzellen aufgenommen werden kann, wodurch der Hedgehog-Signalweg in den Tumorzellen aktiviert wird. Den verschiedenen Tumorentitäten können verschiedene Mechanismen zugeordnet werden. So stellen beispielsweise das Basalzellkarzinom und das Medulloblastom Vertreter des ligandenunabhängigen Modells dar, während das Pankreaskarzinom (mit gewissen Ausnahmen) und das Mammakarzinom am ehesten einen autokrinen Mechanismus zeigen. Für Prostatakarzinome wird der parakrine Ablauf vermutet, während hämatologische Krebserkrankungen dem reversen parakrinen Modell zu folgen scheinen (Scales und Sauvage 2009, Merchant und Matsui 2010). Sowohl für die parakrine als auch für die reverse parakrine Form sind Stromazellen demnach von entscheidender Bedeutung. Die Annahme eines revers parakrinen Modells in Leukämiezellen kann durch verschiedene Forschungsresultate unterstützt werden. So konnte parallel zu dieser Arbeit in einem anderen Teilprojekt unseres Labors gezeigt werden, dass AML-Zellen selbst keine Hedgehog-Liganden exprimieren, während Osteoblasten und Endothelzellen im AML-Knochenmark das Hedgehog-Protein Dhh exprimieren (Wellbrock et al. 2013). Diese Ergebnisse bekräftigen die These des reversen parakrinen Modells. Dierks et al. konnten außerdem nachweisen, dass durch Stromazellen produziertes Shh und Ihh das Wachstum und das Überleben von Plasmozytom- und Lymphomzellen sowohl in vitro als auch in vivo ermöglichen und fördern, während es bei in vitro-Versuchen mit fehlendem Stroma in den veröffentlichten Experimenten innerhalb von 24 Stunden zum Zelltod kam. Weiter konnte eine Zugabe von durch Stromazellen produziertem Medium das Überleben von Lymphomzellen verbessern. Das Hinzufügen von Shh, beziehungsweise Ihh zu stromafreien Tumorzellen führte im Gegensatz zu anderen Faktoren wie zum

Beispiel Interleukin-3 oder GM-CSF zu einer Steigerung der Proliferation (Dierks et al. 2007). Diese Beobachtungen untermauern weiter die Vermutung für das reverse parakrine Modell in hämatologischen Neoplasien. Yauch et al. konnten die Annahme eines parakrinen Modells des Hedgehog-Signalwegs in soliden Tumorerkrankungen durch die Resultate von in vitro- und in vivo-Versuchen stützen. In verschiedenen in vitro-Versuchen konnte zwar durch Smo-Antagonisten eine Wachstumshemmung in mehreren epithelialen Tumorzelllinien erzielt werden, jedoch keine durch Hemmung des Hedgehog-Signalwegs zu erwartende Veränderung des Hedgehog-Zielgens Gli1 auf mRNA-Ebene. Ein Effekt auf die Zielgene im Tumor konnte auch nicht mittels Stimulation durch das rekombinante Shh erreicht werden. Durch Mikroarray-Expressionsanalysen und quantitative Real-Time-PCR-Analysen wurde jedoch ein verstärktes Vorkommen von Shh und beziehungsweise oder Ihh in bestimmten Tumorzelllinien nachgewiesen. Eine Kokultivierung mit Gli-Reporter transfizierten 10T1/2-Zellen ergab eine Korrelation zwischen dem Grad der Sezernierung der Hedgehog-Liganden und der Gli-Reporter-Aktivierung in verschiedenen Tumorzelllinien. Diese in vitro-Ergebnisse untermauern den vermuteten parakrinen Mechanismus des Hedgehog-Signalwegs in soliden Tumoren. Auch einige in vivo-Experimente von Yauch et al. unterstützen die Hypothese eines parakrinen Modells in bestimmten Tumorentitäten. Hierbei wurden unter anderem die Pankreastumorzelllinien HPAF-II und PL45 in Ptch1-lacZ;Rag2<sup>-/-</sup>-Mäuse xenotransplantiert. HPAF-II-Zellen sezernieren im Gegensatz zu PL45-Zellen viel Hedgehog-Protein. Durch Färbung mit Anti-ß-Galaktosidase zeigte sich bei den HPAF-II-Xenotransplantaten eine zügige Färbung der den Tumor umgebenenden Stromazellen, welche bei den PL45-Xenotransplantaten ausblieb. Weiter wurden chirurgische Biopsate verschiedener Neoplasien in nackte Mäuse xenotransplantiert. In Spezies-spezifischen Primer/Proben-Sets konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Hedgehog-Expression in den Tumorzellen und der Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs in den Stromazellen, nicht aber mit der Aktivierung des Signalwegs in den Tumorzellen selbst, hergestellt werden. Diese Ergebnisse konnten durch sich anschließende guantitative Real-Time-PCR-Analysen untermauert werden und unterstützen die These eines parakrinen Mechanismus (Yauch et al. 2008).

Aufgrund der Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und veröffentlichten Resultaten anderer Forschungsgruppen, wie zum Beispiel denen von Fukushima *et al.*, müssen ferner mögliche Fehlerquellen in den verwendeten Methoden, beziehungsweise in den Versuchsdurchführungen in Betracht gezogen werden. Eine potenzielle Erklärung für den ausbleibenden Inhibitor-Effekt auf die Proliferation der Zelllinien stellt die verwendete Inhibitor-Konzentration dar. So muss erwogen werden, ob eventuell eine höhere Konzentration benötigt worden wäre um die Proliferation zu beeinflussen. Allerdings beträgt die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) von PF-04449913 5 nM. Dementsprechen wird eine Konzentration von 5 nM benötigt, um bei *in vitro*-Versuchen eine 50%ige Hemmung zu erreichen (Munchhof *et al.* 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde der Inhibitor mit Konzentrationen von 1 µM und 0,1 µM verwendet und hätte somit in Anbetracht der IC<sub>50</sub> ausreichend dosiert sein müssen. Guadagnulo *et al.* untersuchten die Wirkung des Inhibitors auf die Proliferation sogar in einer deutlich größeren Konzentrationsspanne als in dieser Arbeit, nämlich in Konzentrationen von 10 nM bis 100 M und konnten dennoch keine Proliferationshemmung in AML-Zellen beobachten. Ferner lassen sich Schwankungen in den Untersuchungsbedingungen auch bei

großer experimenteller Sorgfalt nicht vollständig vermeiden. Die Zellsuspensionen in den einzelnen Wells der Proliferations-Assays wurden vor jeder Auszählung lichtmikroskopisch begutachtet, um eine Kontamination mit Bakterien oder Pilzen ausschließen und so verfälschte Ergebnisse verhindern zu können. Des Weiteren wurde stets unter einer sterilen Werkbank und möglichst mit derselben Pipette gearbeitet, um leichte Abweichungen beim Pipettieren zu vermeiden. Dennoch können mit dem bloßen Auge nicht sichtbare Kontaminationen oder Pipettierungsungenauigkeiten nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. In Anbetracht der unter den Duplikaten und unterschiedlichen Zelllinien sehr homogenen Resultate sind diese Fehlerquellen als Ursache der fehlenden Veränderung im Proliferationsverhalten der Zellen allerdings als eher unwahrscheinlich einzuordnen.

Weiter muss auch vor allem aufgrund der widersprüchlichen Resultate anderer Forschungsgruppen bezüglich der Expression der Hedgehog-Gene an Fehler in den Ergebnissen der PCR-Analysen gedacht werden. Die einzelnen Schritte von der Kultivierung der Zellen in der Zellkultur, über die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese bis hin zur qRT-PCR bergen multiple Fehlerquellen. Um diese zu minimieren, wurden während der Versuchsdurchführung verschiedene Maßnahmen zur Qualitätssicherung ergriffen. Jede einzelne Probe wurde als Duplikat im LightCycler untersucht. Zwischen den beiden Duplikaten wurden nur sehr geringe Abweichungen akzeptiert. Bei unklarer oder etwas größerer Abweichung wurde der Versuch wiederholt. Des Weiteren wurden die einzelnen Schmelzkurven analysiert um unspezifische Primer-Dimere auszuschließen. Durch die verwendete Verdünnungsreihe konnte die Effizienz der PCR beurteilt werden. Weiterhin wurde jeder Versuch mindestens zweimal durchgeführt.

Obgleich in dieser Arbeit kein Effekt durch den Smo-Inhibitor PF-04449913 auf die untersuchten AML-Tumorzelllinien erreicht werden konnte, sprechen die zahlreichen bisherigen Forschungsresultate dem Hedgehog-Signalweg dennoch einen wichtigen Stellenwert in der Tumorgenese vieler verschiedener Tumorentitäten zu. Dies gilt sowohl für hämatologische Tumorerkrankungen als auch für solide Tumore. Die aktuellen Forschungsstandpunkte weisen unter anderem auf die Existenz eines parakrinen, beziehungsweise eines reversen parakrinen Modells in hämatologischen Zellen hin. Hierbei bilden Stromazellen einen wichtigen Grundbestandteil. Dies wiederum würde erklären, weshalb in den Versuchen dieser Arbeit aufgrund der Abwesenheit von Stromazellen keine Hemmung des Hedgehog-Signalwegs durch Anwendung des Smo-Inhibitors nachgewiesen werden konnte. Auch die aktuellen klinischen Resultate sprechen für die Bedeutung von Stromazellen. Nicht nur in in vivo-und ex vivo-Versuchen konnte eine Beeinflussung von Tumorzellen, beziehungsweise Tumoren beobachtet werden, sondern auch in den erfolgten klinischen Studien. Hier konnte durch den Smo-Inhibitor PF-04449913 ein Therapieansprechen in hämatologischen Tumorerkrankungen erzielt werden. Es konnte sowohl eine Reduktion der Blastenzahlen, als auch einmal eine komplette Remission erreicht werden (Jamieson et al. 2011). Weitere Studien befinden sich derzeit noch in der Durchführuna.

Vor allem die klinische Zulassung des Smo-Inhibitors GDC-0449 für die Behandlung von fortgeschrittenen Basalzellkarzinomen zeigt den Erfolg und die Wichtigkeit neuer Ansatzpunkte dieses Mechanismus in der Tumortherapie. Gegenwärtig konzentrieren sich die Forschungsschwerpunkte in

der Klinik vor allem auf die Smo-Inhibitoren. Wie in dieser Arbeit aufgezeigt bietet der komplexe Hedgehog-Signalweg für Inhibitoren jedoch noch zahlreiche weitere Angriffspunkte als den Smo-Rezeptor, weshalb zukünftige Forschung auf diesem Gebiet von großer Bedeutung ist. So existieren Hemmstoffe, welche den Signalweg oberhalb von Smo inhibieren. Hier sind vor allem der Hedgehog-Antikörper 5E1 und das Robotnikinin bekannt (Trinh et al. 2014). Beide verhindern das Binden der Hedgehog-Liganden an den Rezeptor Ptch und unterbinden somit eine Aktivierung der Signalkaskade. Diese und auch die Smo-Inhibitoren haben jedoch den Nachteil, dass sie nicht auf den ligandenunabhängigen Hedgehog-Signalweg wirken, je nachdem auf welcher Stufe der Signalkaskade sich die Mutation befindet. Dies schränkt ihre Anwendung in der Therapie deutlich ein. Des Weiteren wurde bereits von entwickelten Resistenzen gegenüber Smo-Inhibitoren berichtet (Rudin et al. 2009). Problematisch ist hier vor allem, dass sich die chemischen Strukturen der verschiedenen Smo-Inhibitoren sehr ähnlich sind und erworbene Resistenzen so mit hoher Wahrscheinlichkeit gleichzeitig für mehrere Smo-Inhibitoren gelten (Trinh et al. 2014). Einen Vorteil hierzu stellen die Gli-Inhibitoren dar, die ihre Wirkung downstream von Smoothened ausüben und somit ligandenunabhängig und in ihrer Wirkung weder von Ptch- noch Smo-Mutationen abhängig sind. Auch für diese bestehen bereits Forschungsergebnisse. Am bekanntesten sind die Vertreter GANT-58 und GANT-61 (Mazumdar et al. 2011, Trinh et al. 2014). So konnte in unserer Arbeitsgruppe durch Wellbrock et al. mittels GANT-61 eine signifikante Verminderung der Zellzahl primärer AML-Zellen erreicht werden. Auch zeigte sich eine Wirksamkeit im Sinne einer Hemmung auf die Colony-Formations-Kapazität von AML-Zelllinien und primären AML-Zellen. Zusätzlich konnte in AML-Zelllinien die Apoptose induziert und diese in primären AML-Zellen gesteigert werden (Wellbrock et al. 2013). Des Weiteren konnte ein deutlich reduziertes Überleben durch GANT61 im Vergleich zu Cyclopamin durch Pan et al. in den Zelllinien K562, Kasumi-1, HL60 und U937 beobachten werden (Pan et al. 2012). 2010 konnten Desch et al. durch Gli-Hemmung mit GANT61 in CLL-Zellen eine Apoptose induzieren, während sich nach Smo-Inhibierung mittels Cyclopamin kein gesteigerter Zelltod und mittels Smo-Inhibitor SANT-1 kaum ein Einsetzen der Apoptose nachweisen ließ (Desch et al. 2010). Diese Erkenntnisse lassen ein Eingreifen in den Hedgehog-Signalweg auf Gli-Ebene als erfolgsversprechende Alternative zur Smo-Inhibierung in der AML sehen.

Angesichts des klinischen Erfolgs des Smo-Inhibitors PF-04449913 und vor allem aufgrund der weiterhin nicht befriedigenden Prognose der akuten myeloischen Leukämie ist eine intensive weiterführende Forschung in diesem Gebiet zukünftig von großer Bedeutung und Relevanz. Die vorliegende Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag in diesem Bereich, da sie den ausbleibenden Effekt des Smo-Inhibitors in *in vitro*-Versuchen darstellt und im Vergleich mit positiven Ergebnissen anderer Forschungsgruppen und auch anderen Smo-Inhibitoren die Relevanz von Stromazellen im Hedgehog-Signalweg herausarbeitet und somit zum Erfolg weiterführender Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet maßgeblich beiträgt.

### 6 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie (AML) macht einen Großteil der hämatologischen Neoplasien aus. Ihre Standardtherapie hat sich in den vergangenen Jahren wenig weiterentwickelt, sodass die Prognose weiterhin unbefriedigend ist. Gemäß der Stammzellhypothese existieren leukämische Stammzellen, die den bisherigen Therapien entgehen können und somit verantwortlich für die mangelhafte Heilungsrate und das Auftreten von Rezidiven sind. Aus diesem Grund sind Forschungsansätze, die diese Tumorstammzellen angreifen, von entscheidender Bedeutung. Der Hedgehog-Signalweg stellt eine Perspektive zur zielgerichteten Therapie ("targeted cancer therapy") dar. Sowohl in soliden als auch hämatologischen Neoplasien konnte ein pathologisch aktivierter Hedgehog-Signalweg nachgewiesen werden. Ein Durchbruch diesbezüglicher Forschung wurde im Jahr 2012 durch die Zulassung des Smoothened-Inhibitors GDC-0449 zur Behandlung von fortgeschrittenen Basalzellkarzinomen erreicht. Die meisten Forschungsergebnisse zeigen einen Zusammenhang zwischen dem Hedgehog-Signalweg und der Hämatopoese und lassen ihn somit als ein vielversprechendes Ziel in der spezifischen Therapie der AML erscheinen.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung des Smo-Inhibitors PF-04449913 auf die AML-Zelllinien Kasumi-1, SKM-1 und U937 *in vitro* analysiert. Hierfür wurden Proliferations-Assays über drei Tage und nachfolgend über zwei Wochen durchgeführt. Weder durch den Inhibitor noch durch das Sonic Hedgehog-Protein wurde jedoch eine Veränderung der Zellproliferation erreicht. Auch die Untersuchungen zur Colony-Formations-Kapazität zeigten keinen Einfluss des Inhibitors oder des Hedgehog-Liganden. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnten auch die quantitativen PCR-Analysen keinen Effekt durch PF-04449913 und Shh auf die Genexpression der Hedgehog-Zielgene Gli1-3 sowie der Stammzellgene LKB-1, KLF4, NANOG, POU5F1, PRDM14 und SOX2 bestätigen. Obgleich die Ergebnisse dieser Arbeit keinen Effekt des Smo-Inhibitors PF-04449913 auf den Hedgehog-Signalweg nachweisen konnten, sprechen in der Literatur beschriebene *in vitro-, in vivo-* und klinische Phase-I- und –II-Studien für einen therapierelevanten Einfluss des Inhibitors. Als wahrscheinlichste Erklärung für einen ausbleibenden Einfluss des Inhibitors auf die AML-Zelllinien in der vorliegenden Arbeit wird das Fehlen von Stromazellen gesehen, welche für den Hedgehog-Signalweg in bestimmten Tumorentitäten essenziell zu sein scheinen.

Um die direkte und indirekte Wirkung des Smo-Inhibitors auf AML-Zellen endgültig zu klären, bedarf es weitergehender Forschung. Zudem sind in der Literatur bereits erworbene Resistenzen gegenüber Smoothened-Inhibitoren beschrieben. Aufgrund der ähnlichen chemischen Strukturen der einzelnen Smoothened-Inhibitoren stellt dies ihren therapeutischen Einsatz vor eine weitere Herausforderung. So sollten auch andere Ansatzpunkte des Hedgehog-Signalwegs in den Fokus der Forschung gelangen. Zum Beispiel können Gli-Inhibitoren aufgrund ihrer Unabhängigkeit von den Hedgehog-Liganden sowie den Rezeptoren Patched und Smoothened ein breiteres Wirkspektrum zeigen. Zusammengefasst sprechen die bisherigen Forschungsresultate dafür, dass eine Hemmung des Hedgehog-Signalwegs durch Smoothend-Inhibitoren eine zukunftsgerichtete Ergänzung in der bisherigen Antitumortherapie darstellt.

## 7 Anhang

### Tabellenanhang

| Ansatz  | Versuch | Gli1 8h   | Gli1 24 h | Gli2 8h | Gli2 24h | Gli3 8h   | Gli3 24h  |
|---------|---------|-----------|-----------|---------|----------|-----------|-----------|
| DMSO    | 1       | 100       | 100       | 100     | 100      | 100       | 100       |
|         | 2       | 100       | 100       | х       | х        | 100       | 100       |
|         | 3       | 100       | 100       |         |          |           |           |
|         | ø       | 100 ± 0,0 | 100 ± 0,0 | 100     | 100      | 100 ± 0,0 | 100 ± 0,0 |
| Inh     | 1       | 172       | 53        | 86      | 137      | 149       | 60        |
|         | 2       | 325       | 56        | х       | х        | 109       | 89        |
|         | 3       | 91        | 136       |         |          |           |           |
|         | ø       | 196±118,9 | 82±47,2   | 86      | 137      | 129±27,9  | 75±20,4   |
| Shh     | 1       | 57        | 106       | 36      | 145      | 53        | 33        |
|         | 2       | 90        | 62        | х       | х        | 110       | 93        |
|         | 3       | 109       | 139       |         |          |           |           |
|         | ø       | 85±26,3   | 102±38,9  | 36      | 145      | 81±40,5   | 63±42,1   |
| Inh+Shh | 1       | 63        | 77        | 112     | 48       | 56        | 18        |
|         | 2       | 108       | 89        | Х       | Х        | 82        | 84        |
|         | 3       | 67        | 105       |         |          |           |           |
|         | ø       | 79±25,2   | 91±14,0   | 112     | 48       | 69±18,2   | 51±46,3   |

#### Detaillierte Tabelle der relativen mRNA-Expression von Gli1-3 in den Kasumi-1-Zellen (Vgl. S. 31)

Die Tabelle zeigt eine Übersicht aus den Einzelwerten sowie des errechneten Mittelwerts und der jeweiligen Standardabweichung der einzelnen Versuche in Prozent auf die Nullkontrolle normiert. Für den Transkriptionsfaktor Gli2 konnte im zweiten Versuch keine Expression nachgewiesen werden. Aus diesem Grund befinden sich keine Werte in der Tabelle (X), sodass der dargestellte Mittelwert dem Einzelwert entspricht. Folglich existiert für Gli2 keine Standardabweichung.

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Gli1-3 = Glioma-assoziiertes Onkogen 1-3, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

| Ansatz  | Versuch | Gli1 8h   | Gli1 24 h | Gli2 8h   | Gli2 24h | Gli3 8h  | Gli3 24h |
|---------|---------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|----------|
| DMSO    | 1       | 100       | 100       | 100       | 100      | 100      | Х        |
|         | 2       | 100       | 100       | 100       | х        | 100      | х        |
|         | 3       | 100       | 100       |           |          |          |          |
|         | ø       | 100 ± 0   | 100 ± 0   | 100 ± 0   | 100      | 100 ± 0  |          |
| Inh     | 1       | 212       | 107       | 71        | 2089     | 51       | х        |
|         | 2       | 590       | 89        | 173       | х        | 83       | х        |
|         | 3       | 141       | 282       |           |          |          |          |
|         | ø       | 314±241,4 | 159±106,5 | 122±72,2  | 2089     | 67±22,2  |          |
| Shh     | 1       | 162       | 89        | 17        | 2538     | 162      | Х        |
|         | 2       | 269       | 77        | 148       | х        | 269      | х        |
|         | 3       | 135       | 134       |           |          |          |          |
|         | ø       | 189±70,5  | 100±30,0  | 82±92,3   | 2538     | 13±140,6 |          |
| Inh+Shh | 1       | 263       | 156       | 18        | 349      | 95       | Х        |
|         | 2       | 361       | 159       | 188       | х        | 3        | х        |
|         | 3       | 158       | 139       |           |          |          |          |
|         | ø       | 261±101,9 | 151±11,1  | 103±119,8 | 349      | 49±65,6  |          |

Detaillierte Tabelle der relativen mRNA-Expression von Gli1-3 in den SKM-1-Zellen (Vgl. S. 33)

Die Tabelle zeigt eine Übersicht aus den Einzelwerten sowie des errechneten Mittelwerts und der jeweiligen Standardabweichung der einzelnen Versuche in Prozent auf die Nullkontrolle normiert. Für den Transkriptionsfaktor Gli2 konnte im zweiten Versuch nach 24-stündiger Inkubation keine Expression nachgewiesen werden sodass der dargestellte Mittelwert dem Einzelwert entspricht. Aus diesem Grund befinden sich keine Werte in der Tabelle (X). Folglich gibt es hier keine Standardabweichung. Dies gilt ebenso für Gli3, für das sich in beiden versuchen keine Expression nachweisen ließ. Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Gli1-3 = Glioma-assoziiertes Onkogen 1-3, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

| Ansatz  | Versuch | Gli1 8h   | Gli1 24 h | Gli2 8h | Gli2 24h | Gli3 8h   | Gli3 24h  |
|---------|---------|-----------|-----------|---------|----------|-----------|-----------|
| DMSO    | 1       | 100       | 100       | Х       | Х        | 100       | 100       |
|         | 2       | 100       | 100       | х       | х        | 100       | 100       |
|         | 3       | 100       | 100       |         |          |           |           |
|         | ø       | 100 ± 0,0 | 100 ± 0,0 |         |          | 100 ± 0,0 | 100 ± 0,0 |
| Inh     | 1       | 1235      | 280       | Х       | Х        | 251       | 209       |
|         | 2       | 208       | 54        | Х       | Х        | 208       | 54        |
|         | 3       | 208       | 63        |         |          |           |           |
|         | ø       | 550±592,9 | 132±127,9 |         |          | 230±30,05 | 131±109,9 |
| Shh     | 1       | 359       | 24        | Х       | Х        | 246       | 36        |
|         | 2       | 311       | 359       | х       | х        | 311       | 359       |
|         | 3       | 15        | 142       |         |          |           |           |
|         | ø       | 228±186,3 | 175±169,8 |         |          | 278±46,2  | 197±228,3 |
| Inh+Shh | 1       | 330       | 92        | Х       | Х        | 22        | 108       |
|         | 2       | 64        | 381       | х       | х        | 64        | 381       |
|         | 3       | 206       | 56        |         |          |           |           |
|         | ø       | 200±133,0 | 176±178,1 |         |          | 43±29,3   | 244±193,0 |

Detaillierte Tabelle der relativen mRNA-Expression von Gli1-3 in den U937-Zellen (Vgl. S. 34)

Die Tabelle zeigt eine Übersicht aus den Einzelwerten sowie des errechneten Mittelwerts und der jeweiligen Standardabweichung der einzelnen Versuche in Prozent auf die Nullkontrolle normiert. Für den Transkriptionsfaktor Gli2 konnte weder nach kurzzeitiger noch langzeitiger Inkubation eine Expression nachgewiesen werden, sodass hier kein Wert eingetragen ist (X).

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Gli1-3 = Glioma-assoziiertes Onkogen 1-3, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

| Ansatz  | Versuch | KLF4 8h  | KLF4 24h | LKB1 8h  | LKB1 24h | NANOG 8h | NANOG 24h | POU5F1 8h | POU5F1 24h |
|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|------------|
| DMSO    | 1       | 100      | 100      | 100      | 100      | 100      | 100       | 100       | 100        |
|         | 2       | 100      | 100      | 100      | 100      | 100      | 100       | 100       | 100        |
|         | ø       | 100 ±0,0 | 100 ±0,0 | 100 ±0,0 | 100 ±0,0 | 100 ±0,0 | 100 ±0,0  | 100 ±0,0  | 100 ±0,0   |
| Inh     | 1       | 107      | Х        | 100      | 96       | 102      | 99        | 104       | 99         |
|         | 2       | 96       | 103      | 102      | 101      | 98       | 99        | 105       | 103        |
|         | ø       | 101±7,4  | 103      | 101±1,0  | 99±3,6   | 100±3,2  | 99±0,2    | 104±1,2   | 101±2,9    |
| Shh     | 1       | 94       | 98       | 99       | 99       | 95       | 94        | 102       | 97         |
|         | 2       | 90       | 106      | 100      | 100      | 98       | 100       | 100       | 90         |
|         | ø       | 92±2,4   | 102±5,6  | 99±0,4   | 99±0,9   | 97±2,3   | 97±3,8    | 101±1,3   | 93±4,5     |
| Inh+Shh | 1       | 96       | 98       | 98       | 99       | 95       | 92        | 100       | 97         |
|         | 2       | 96       | 90       | 98       | 99       | 99       | 98        | 91        | 91         |
|         | ø       | 96±0,2   | 94±5,7   | 98±0,1   | 99±0,1   | 97±2,2   | 95±4,3    | 95±6,6    | 94±4,0     |

Detaillierte Tabelle über die relative mRNA-Expression der Stammzellgene in den Kasumi-1-Zellen (Vgl. S. 37)

Die Tabelle zeigt eine Übersicht aus den Einzelwerten sowie des errechneten Mittelwerts und der jeweiligen Standardabweichung der einzelnen Versuche in Prozent auf die Nullkontrolle normiert. Für das Stammzellgen KLF4 kam es nach 24-stündiger Inkubation für die Probe mit Zugabe des Inh in einem der beiden Versuche zu keiner Expression (X). Folglich ist in der Tabelle nur ein Wert ohne Standardabweichung eingetragen.

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein

| Ansatz  | Versuch | KLF4 8h   | KLF4 24 h | LKB 8h    | LKB 24h   | NANOG 8h  | NANOG 24h | POU5F1 8h | POU5F1 24h |
|---------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| DMSO    | 1       | 100       | 100       | 100       | 100       | 100       | 100       | 100       | 100        |
|         | 2       | 100       | 100       | 100       | 100       | 100       | 100       | 100       | 100        |
|         | ø       | 100 ± 0,0 | 100 ± 0,0 | 100 ± 0,0 | 100 ± 0,0 | 100 ± 0,0 | 100 ± 0,0 | 100 ± 0,0 | 100 ± 0,0  |
| Inh     | 1       | 100       | 102       | 105       | 101       | 99        | 109       | 100       | 106        |
|         | 2       | 96        | 103       | 100       | 106       | 94        | 94        | 94        | 96         |
|         | ø       | 98±3,1    | 103±0,8   | 102± 3,6  | 104 ±3,5  | 96±3,7    | 102±10,6  | 97±4,1    | 101±6,8    |
| Shh     | 1       | 99        | 98        | 102       | 96        | 102       | 100       | 99        | 100        |
|         | 2       | 99        | 84        | 104       | 86        | 99        | 80        | 99        | 83         |
|         | ø       | 99±0,1    | 91±9,9    | 103 ±1,1  | 91 ±7,6   | 101±2,2   | 90±14,1   | 99±0,1    | 91±11,6    |
| Inh+Shh | 1       | 102       | 103       | 105       | 104       | 109       | 109       | 104       | 106        |
|         | 2       | 95        | 87        | 105       | 90        | 97        | 85        | 98        | 86         |
|         | ø       | 99±4,9    | 95±11,0   | 105 ±0,1  | 97 ±9,9   | 103±8,4   | 97±16,6   | 101±4,3   | 96±13,6    |

Detaillierte Tabelle über die relative mRNA-Expression der Stammzellgene in den SKM-1-Zellen (Vgl. S. 39)

Die Tabelle zeigt eine Übersicht aus den Einzelwerten sowie des errechneten Mittelwerts und der jeweiligen Standardabweichung der einzelnen Versuche in Prozent auf die Nullkontrolle normiert. Aufgrund fehlender Expression sind die Werte für PRDM14 und SOX2 nicht tabellarisch dargestellt.

Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

| Ansatz  | Versuch | KLF4 8h | KLF4 24 h | LKB 8h  | LKB 24h | NANOG 8h | NANOG 24h | POU5F1 8h | POU5F1 24h |
|---------|---------|---------|-----------|---------|---------|----------|-----------|-----------|------------|
| DMSO    | 1       | 100     | 100       | 100     | 100     | 100      | 100       | 100       | 100        |
|         | 2       | 100     | 100       | 100     | 100     | 100      | 100       | 100       | 100        |
|         | ø       | 100±0,0 | 100±0,0   | 100±0,0 | 100±0,0 | 100±0,0  | 100±0,0   | 100±0,0   | 100±0,0    |
| Inh     | 1       | 92      | 98        | 97      | 96      | 82       | 97        | 85        | 100        |
|         | 2       | 99      | 101       | 100     | 101     | 103      | 102       | 102       | 102        |
|         | ø       | 95±4,6  | 99±2,1    | 98±1,8  | 99±3,9  | 93±14,2  | 99±3,4    | 93±11,6   | 101±1,4    |
| Shh     | 1       | 90      | 101       | 97      | 102     | 89       | 103       | 90        | 103        |
|         | 2       | 96      | 100       | 100     | 102     | 98       | 98        | 97        | 100        |
|         | ø       | 93±4,3  | 100±0,8   | 98±2,4  | 102±0,2 | 94±6,5   | 101±3,6   | 93±5,0    | 102±2,3    |
| Inh+Shh | 1       | 101     | 98        | 102     | 99      | 108      | 95        | 111       | 98         |
|         | 2       | 100     | 102       | 98      | 103     | 100      | 99        | 98        | 101        |
|         | ø       | 101±1,0 | 100±2,9   | 100±2,1 | 101±2,8 | 104±61   | 97±2,9    | 105±8,8   | 100±2,5    |

| Ansatz  | Versuch | SOX28h  | SOX2 24h |
|---------|---------|---------|----------|
| DMSO    | 1       | 100     | 100      |
|         | 2       | 100     | х        |
|         | ø       | 100±0,0 | 100      |
| Inh     | 1       | 72      | 100      |
|         | 2       | 98      | Х        |
|         | ø       | 85±18,6 | 100      |
| Shh     | 1       | 90      | 97       |
|         | 2       | 94      | Х        |
|         | ø       | 92±2,7  | 97       |
| Inh+Shh | 1       | 103     | 95       |
|         | 2       | 98      | Х        |
|         | ø       | 100±3,0 | 95       |

### Detaillierte Tabelle über die relative mRNA-Expression der Stammzellgene in U937-Zellen (Vgl. S. 41)

Die Tabelle zeigt eine Übersicht aus den Einzelwerten sowie des errechneten Mittelwerts und der jeweiligen Standardabweichung der einzelnen Versuche in Prozent auf die Nullkontrolle normiert. Aufgrund fehlender Expression sind die Werte für PRDM14 nicht tabellarisch dargestellt. Das Stammzellgen SOX2 wurde in Versuch 2 nach 24-stündiger Inkubation ebenfalls nicht exprimiert (X) und somit ist hierfür nur der Einzelwert ohne Standardabweichung aufgeführt. Abkürzungen: DMSO = Dimethylsulfoxid, Inh = Smoothened-Inhibitor, Shh = Sonic Hedgehog-Protein.

## Tabellenverzeichnis

| Tabelle 1: WHO-Klassifikation der AML (2008) entnommen aus (Vardiman et al. 2009)                     | 4    |
|---|------|
| Tabelle 2: Primer und PCR-Bedingungen   | . 24 |
| Tabelle 3: Relative mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Gli1-3 in den Kasumi-1-         Zellen | . 31 |
| Tabelle 4: Relative mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Gli1-3 in den SKM-1-         Zellen    | . 33 |
| Tabelle 5: Relative mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Gli1-3 in den U937-<br>Zellen          | . 34 |
| Tabelle 6: Relative mRNA-Expression der Stammzellgene in den Kasumi-1-Zellen                          | . 37 |
| Tabelle 7: Relative mRNA-Expression der Stammzellgene in den SKM-1-Zellen                             | . 39 |
| Tabelle 8: Relative mRNA-Expression der Stammzellgene in U937-Zellen                                  | . 41 |

# Abbildungsverzeichnis

| Abbildung 1: Der hierarchische Aufbau der Hämatopoese (Denham 2005)7   |
|--|
| Abbildung 2: Die hämatopoetische Stammzellnische (modifiziert nach Li und Xie 2005) 9  |
| Abbildung 3: Die schematische Darstellung des Hedgehog-Signalwegs in Vertebraten (Mar et al. 2011)                           |
| Abbildung 4: Anatomische Lokalisation der Hämatopoese in der Maus (modifiziert nach Chotinantakul und Leeanansaksiri 2012)14 |
| Abbildung 5: Die Zellvitalität in Abhängigkeit von der FBS-Konzentration des Mediums 25                                      |
| Abbildung 6: Der Einfluss des Smo-Inhibitors auf die Proliferation in den AML-Zelllinien SKM-1 und U937                      |
| Abbildung 7: Langzeitproliferation unter kontinuierlicher Stimulation mit dem Smo-Inhibitor und Shh                          |
| Abbildung 8: Der Einfluss des Smo-Inhibitors und von Shh auf die Koloniebildung der Zelllinien Kasumi-1 und SKM-1            |
| Abbildung 9: Der Einfluss des Smo-Inhibitors und von Shh auf die Expression der Gli-<br>Gene in den Kasumi-1-Zellen          |
| Abbildung 10: Der Einfluss des Smo-Inhibitors und von Shh auf die Expression der Gli-<br>Gene in den SKM-1-Zellen            |
| Abbildung 11: Der Einfluss des Smo-Inhibitors und von Shh auf die Expression der Gli-<br>Gene in der U937-Zelllinie          |
| Abbildung 12: Der Einfluss des Smo-Inhibitors und von Shh auf die Stammzellgen-<br>Expression in den Kasumi-1-Zellen         |
| Abbildung 13: Der Einfluss des Smo-Inhibitors und von Shh auf die Stammzellgen-<br>Expression in den SKM-1-Zellen            |
| Abbildung 14: Der Einfluss des Smo-Inhibitors und von Shh auf die Stammzellgen-<br>Expression in den U937-Zellen             |

# Abkürzungsverzeichnis

| 7G3      | Anti-CD123-Antikörper                      |
|----------|--|
| AGM      | Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region           |
| AML      | Akute myeloische Leukämie                  |
| AraC     | Cytarabin                                  |
| ATCC     | American Type Culture Collection           |
| BCC      | Basalzellkarzinom                          |
| cDNA     | Complementary DNA                          |
| CEBPA    | CCAAT/Enhancer-Binding-Protein-Alpha       |
| CK1      | Caseinkinase 1                             |
| CLP      | Gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle        |
| CML      | Chronische myeloische Leukämie             |
| CMML     | Chronische myelomonozytische Leukämie      |
| CMP      | Gemeinsame myeloide Vorläuferzelle         |
| Dhh      | Desert Hedgehog                            |
| Disp     | Dispatched                                 |
| DMSO     | Dimethylsulfoxid                           |
| DNA      | Desoxyribonukleinsäure                     |
| DNR      | Daunorubicin                               |
| E        | Embryonaltag                               |
| EPO      | Erythropoietin                             |
| FBS      | Fetal Bovine Serum (fötales Kälberserum)   |
| FDA      | Food and Drug Administration               |
| FLT3     | Fms-like-tyrosine-kinase-3-Gen             |
| FLT3-ITD | FLT3 mit interner Tandemduplikation        |
| G0-Phase | Ruhephase im Zellzyklus                    |
| GAPDH    | Glyceraldehyde-3-Phosphatase Dehydrogenase |
| G-CSF    | Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor |
| Gli      | Gliom-assoziiertes Onkogen                 |

| Gli <sub>A</sub> | Aktivatorform des Gliom-assoziierten Onkogens          |
|------------------|--|
| Gli <sub>R</sub> | Repressorform des Gliom-assoziierten Onkogens          |
| GM-CSF           | Granulozyten Makrophagen-stiumulierender Faktor        |
| GMP              | Granulozytär-monozytäre Vorläuferzelle                 |
| GPCR             | G-Protein gekoppelter Rezeptor                         |
| GSK3             | Glykogen Synthase Kinase 3                             |
| lhh              | Indian Hedgehog  |
| Hh               | Hedgehog-Protein                                       |
| HPDE-Zellen      | Humane pankreatische duktale Epithelzellen             |
| HPE              | Holoprosencephalie                                     |
| HSC              | Hämatopoetische Stammzelle                             |
| IC <sub>50</sub> | Mittlere inhibitorische Konzentration                  |
| IL               | Interleukin  |
| IL-3             | Interleukin-3  |
| IL-6             | Interleukon-6  |
| Kif7             | Kinesin ähnliches Protein 7                            |
| KLF4             | Kruppel-like factor 4                                  |
| LKB-1            | Liver kinase B1  |
| LSC              | Leukämische Stammzelle                                 |
| LT-HSC           | Long-term HSC  |
| MDS              | Myelodysplastisches Syndrom                            |
| MEP              | Megakaryozytär-erythroide Vorläuferzelle               |
| MF               | Myelofibrose   |
| MPP              | Multipotente Vorläuferzelle                            |
| mRNA             | Messenger RNA  |
| NK               | Natürliche Killerzellen                                |
| NOD              | Nicht-fettleibig-diabetischer-Typ (Non-Obese Diabetic) |
| NPM1             | Nucleophosmin 1  |
| PBS              | Dulbeco's Phosphate-Buffered Saline                    |
| PIN              | Intraepitheliale Neoplasie des Pankreas                |

| РКА             | Proteinkinase A  |
|-----------------|--|
| POU5F1 (=Oct-4) | Octamer binding transcription factor 4                               |
| PRDM14          | PR domain containing 14  |
| Ptch            | Patched  |
| Ptch-1          | Patched-1  |
| Ptch-2          | Patched-2  |
| РТН             | Parathormon  |
| PTHrP           | PTH-related-Peptid   |
| qRT-PCR         | Quantitative Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion                    |
| RPMI            | Rooswell Park Memorial Institut Medium 1640                          |
| SCID            | Schwerer kombinierter Immundefekt (severe combined immunodeficiency) |
| SEER            | Surveillance Epidemiology and End Results                            |
| Shh             | Sonic Hedgehog   |
| Smo             | Smoothened   |
| SNO             | N-Cadherin-positive Osteoblasten                                     |
| SOX2            | Sex determining region Y box 2                                       |
| SP              | Para-aortalen Splanchnopleura  |
| ST-HSC          | Short-term HSC   |
| SuFu            | Supressor of Fused   |

### Literaturverzeichnis

- Adams, G.B. und Scadden, D.T., 2006. The hematopoietic stem cell in its place. *Nature Immunology*, 7 (4), 333–337.
- Ayers, K.L. und Thérond, P.P., 2010. Evaluating Smoothened as a G-protein-coupled receptor for Hedgehog signalling. *Trends in Cell Biology*, 20 (5), 287–298.
- Baron, M., 2003. Embryonic induction of mammalian hematopoiesis. *Experimental Hematology*, 31 (12), 1160–1169.
- Bellusci, S., *et al.*, 1997. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development*, 124 (1), 53–63.
- Bermann, D.M., et al., 2003. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*, 425 (6960), 841–846.
- Bianco, P., 2011. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood*, 117 (20), 5281–5288.
- Bitgood, M.J., Shen, L. und McMahon, A.P., 1996. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Current Biology*, 6 (3), 298–304.
- Blau, H.M., Brazelton, T.R. und Weimann, J.M., 2001. The Evolving Concept of a Stem Cell: Entity or Function? *Cell*, 105 (7), 829–841.
- Bonnet, D. und Dick, J.E., 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3 (7), 730–737.
- Boyer, L.A., *et al.*, 2005. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, 122 (6), 947–956.
- Briscoe, J. und Thérond, P.P., 2013. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14 (7), 418–431.
- Brunangelo, F., *et al.*, 2005. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *New England Journal of Medicine*, 352 (3), 254–266.
- Büchner, T., *et al.*, 2006. Leukämien und myelodysplastisches Syndrom. Akute myeloische Leukämie (AML). In: Kompendium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie. Schmoll, H.-J., *et al.* (Hrsg). 4. Auflage, Band 1. *Springer Medizin Verlag*, Heidelberg, 2605-2045.
- Büchner, T., et al., 2014, Leitlinien der DGHO für die Diagnostik und Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie (AML). DGHO. Berlin [Online im Internet]. URL: https://www.dghoonkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/aml. [Stand: 17.12.2014].
- Buglino, J.A. and Resh, M.D., 2010. Identification of Conserved Regions and Residues within Hedgehog Acyltransferase Critical for Palmitoylation of Sonic Hedgehog. *PLoS ONE*, 5 (6), e11195.
- Buske, C., et al., 2010. Akute myeloische Leukämie. In: Die Onkologie. Hiddemann, W. und Bartram, C.R. (Hrsg.). 2. Auflage, Band 2. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 1637-1671.
- Byrd, N., et al., 2002. Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis. *Development*, 129 (2), 361–372.
- Callejo, A., et al., 2011. Dispatched mediates Hedgehog basolateral release to form the long-range morphogenetic gradient in the Drosophila wing disk epithelium. PNAS, 108 (31), 12591–12598.
- Calvi, L.M., et al., 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature, 425 (6960), 836–841.
- Caro, I. und Low, J.A., 2010. The Role of the Hedgehog Signaling Pathway in the Development of Basal Cell Carcinoma and Opportunities for Treatment. *Clinical Cancer Research*, 16 (13), 3335– 3339.
- Chambers, I., et al., 2003. Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. Cell, 113 (5), 643–655.

- Chamoun, Z., 2001. Skinny Hedgehog, an Acyltransferase Required for Palmitoylation and Activity of the Hedgehog Signal. *Science*, 293 (5537), 2080–2084.
- Chen, X., *et al.*, 2007. Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: It's inhibition leads to growth suppression and apoptosis. *Cancer Science*, 98 (1), 68–76.
- Cheson, B.D., 2003. Revised Recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 21 (24), 4642–4649.
- Chinchilla, P., *et al.*, 2010. Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle. 2010 Feb 1;9(3):570-79.*, 9 (3), 570–579.
- Cirrone, F. und Harris, C.S., 2012. Vismodegib and the Hedgehog Pathway: A New Treatment for Basal Cell Carcinoma. *Clinical Therapeutics*, 34 (10), 2039–2050.
- ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00636610, 2008. A Study of Vismodegib (GDC-0449, Hedgehog Pathway Inhibitor) With Concurrent Chemotherapy and Bevacizumab As First-Line Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. *A service of the U.S. National Institutes of Health.* [Online im Internet].

URL: https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00636610?term=NCT00636610&rank=1. [Stand:17.12.2014].

- ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00833417, 2009. A Study Evaluating the Efficacy and Safety of Vismodegib (GDC-0449, Hedgehog Pathway Inhibitor) in Patients With Advanced Basal Cell Carcinoma. *A service of the U.S. National Institutes of Health.* [Online im Internet]. URL: https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00833417?term=NCT00833417&rank=1. [Stand:17.12.2014].
- ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00887159, 2009. Cisplatin and Etoposide With or Without Vismodegib or Cixutumumab in Treating Patients With Extensive-Stage Small Cell Lung Cancer. A service of the U.S. National Institutes of Health. [Online im Internet]. URL: https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00887159?term=NCT00887159&rank=1. [Stand:17.12.2014].
- ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00957229, 2009. The Purpose of This Study is to Determine The Efficacy and Safety of a Systemic Hedgehog Pathway Antagonist (GDC-0449) in Patients With Basal Cell Nevus Syndrome (BCNS). *A service of the U.S. National Institutes of Health*. [Online im Internet]. URL: https https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00957229?term=NCT00957229&rank=1. [Stand:17.12.2014].
- ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01064622, 2010. Gemcitabine Hydrochloride With or Without Vismodegib in Treating Patients With Recurrent or Metastatic Pancreatic Cancer. *A service of the U.S. National Institutes of Health.* [Online im Internet]. URL: https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01064622?term=NCT01064622&rank=1. [Stand:17.12.2014].
- ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01546038, 2012. A Study To Evaluate PF-04449913 With Chemotherapy In Patients With Acute Myeloid Leukemia or Myelodysplastic Syndrome. A service of the U.S. National Institutes of Health. [Online im Internet]. URL: https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01546038?term=NCT01546038&rank=1. [Stand:27.11.2014].
- ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01841333, 2013. PF-04449913 For Patients With Acute Leukemia at High Risk of Relapse After Donor Stem Cell Transplant. *A service of the U.S. National Institutes of Health.* [Online im Internet]. URL: https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01841333?term=NCT01841333&rank=1#c ontacts. [Stand:17.12.2014].
- Corbit, K.C., et al., 2005. Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. Nature, 437 (7061), 1018–1021.
- Corey, R., et al., 1997. Sporadic Medulloblastomas Contain PTCH Mutations. Cancer Research, 57 (5), 842–845.

- Cridland, S.O., et al., 2009. Indian hedgehog supports definitive erythropoiesis. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 43 (2), 149–155.
- Denham, M., et al., 2005. Stem Cells: An Overview. Current Protocols in Cell Biology, Chapter 23:Unit 23.1.
- Derolf, A.R., *et al.*, 2009. Improved patient survival for acute myeloid leukemia: a population-based study of 9729 patients diagnosed in Sweden between 1973 and 2005. *Blood*, 113 (16), 3666–3672.
- Desch, P., et al., 2010. Inhibition of GLI, but not Smoothened, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. Oncogene, 29 (35), 4885–4895.
- Dierks, C., et al., 2007. Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nature Medicine*, 13 (8), 944–951.
- Dierks, C., *et al.*, 2008. Expansion of Bcr-Abl-Positive Leukemic Stem Cells Is Dependent on Hedgehog Pathway Activation. *Cancer Cell*, 14 (3), 238–249.
- Doan, P.L. and Chute, J.P., 2012. The vascular niche: home for normal and malignant hematopoietic stem cells. *Leukemia*, 26 (1), 54–62.
- Dyer, M.A., *et al.*, 2001. Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development*, 128 (10), 1717–1730.
- Echelard, Y., et al., 1993. Sonic Hedgehog, a Member of a Family of Putative Signaling Molecules, Is Implicated in the Regulation of CNS Polarity. *Cell*, 75 (7), 1417–1430.

Estey, E. und Döhner, H., 2006. Acute myeloid leukaemia. Lancet, 368 (9550), 1894–1907.

- Etheridge, L.A., et al., 2009. Evidence for a role of vertebrate Disp1 in long-range Shh signaling. Development, 137 (1), 133–140.
- Feldmann, G., et al., 2008a. An orally bioavailable small-molecule inhibitor of Hedgehog signaling inhibits tumor initiation and metastasis in pancreatic cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7 (9), 2725–2735.
- Feldmann, G., *et al.*, 2008b. Hedgehog inhibition prolongs survival in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Gut*, 57 (10), 1420–1430.
- Fini, G., et al., 2013. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin-goltz syndrome): Case report. II Giornale di chirurgia, 34 (5/6), 176–179.
- Fukushima, N., et al., 2013. Treatment With Hedgehog Inhibitor, PF-04449913, Attenuates Leukemia-Initiation Potential In Acute Myeloid Leukemia Cells. Abstract. Blood. [Online im Internet]. Washington. URL: http://www.bloodjournal.org/content/122/21/1649?sso-checked=true. [Stand 17.12.2014].
- Gao, J., et al., 2009. Hedgehog Signaling Is Dispensable for Adult Hematopoietic Stem Cell Function. Cell Stem Cell, 4 (6), 548–558.
- Garrido, S.M., et al., 2001. Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and druginduced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5). Experimental Hematology, 29 (4), 448–457.
- Gillett, C.E. und Barnes, D.M., 1998. Demystified ... Cell cycle. *Molecular Pathology*, 51 (6), 310–316.
- Golub, R. und Cumano, A., 2013. Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 51 (4), 226–231.
- Gong, J.K., 1978. Endosteal Marrow: A Rich Source of Hematopoietic Stem Cells. *Science*, 199 (4336), 1443–1445.
- Guadagnuolo, V., et al., 2012. PF-04449913 specifically targets the HH pathway in CD34+ cells and reverts the multi drug resistance mechanism. *hematologica*, 97, 19.
- Guillerman, R.P., Voss, S.D. und Parker, B.R., 2011. Leukemia and Lymphoma. Radiologic Clinics of North America, 49 (4), 767–797.

- Hardcastle, Z., et al., 1998. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in mutants. *Development*, 125 (15), 2803–2811.
- Heissig, B., et al., 2002. Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand. *Cell*, 109 (5), 625–637.
- Hellenbrecht, A., 2006. Responsekriterien für einzelne Leukämieformen. Akute myeloische Leukämie (AML). *Kompetenznetzwerk Leukämien*. [Online im Internet]. URL: http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/fortbildung/responsekriterien/index\_ger.html. [Stand: 17.12.2014].
- Herold, G., et al., 2012. Leukämien. In: Innere Medizin 2013. Herold, G. (Hrsg). 1. Auflage. Gerd Herold Verlag, Köln, 91-100.
- Hill, R.E., Heaney, S.J. und Lettice, L.A., 2003. Sonic hedgehog: restricted expression and limb dysmorphologies. *Journal of Anatomy*, 202 (1), 13–20.
- Howlader, N., *et al.*; 2014. SEER Cancer Statistics Review 1975-2011. *National Cancer Institute*. Bethesda [Online im Internet]. URL: http://seer.cancer.gov/csr/1975\_2011/. [Stand: 26.11.2014].
- Ingham, P.W., Nakano, Y. und Seger, C., 2011. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nature Reviews Genetics*, 12 (6), 393–406.
- Irvine, D.A. und Copland, M., 2012. Targeting hedgehog in hematologic malignancy. *Blood*, 119 (10), 2196–2204.
- Ishikawa, F., et al., 2007. Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nature Biotechnology*, 25 (11), 1315–1321.
- Jackson-Fisher, A.J., *et al.*, 2011. PF-04449913, a small molecule inhibitor of Hedgehog signaling, is effective in inhibiting tumor growth in preclinical models. *Cancer Research* [online], 71 (8), Abstract 4504. Available from: http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/8\_Supplement/4504.short [Accessed 24 Nov 2014].
- Jamieson, C., et al., 2011. Phase 1 Dose-Escalation Study of PF-04449913, An Oral Hedgehog (Hh) Inhibitor, in Patients with Select Hematologic Malignancies. Poster Abstract. ASH Annual Meeting Abstracts. Washington [Online im Internet]. URL: https://ash.confex.com/ash/2011/webprogram/Paper38232.html. [Stand 06.12.2014]
- Jin, L., *et al.*, 2009. Monoclonal Antibody-Mediated Targeting of CD123, IL-3 Receptor α Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 5 (1), 31–42.
- Johnson, R.L., et al., 1996. Human Homolog of patched, a Candidate Gene for the Basal Cell Nevus Syndrome. *Science*, 14 (272), 1668–1671.
- Joshi, P.S., Deshmukh, V. und Golgire, S., 2012. Gorlin-Goltz syndrome: Case Report. *Dental Resaerch Journal*, 9 (1), 100–106.
- Karlou, M., et al., 2012. Hedgehog signaling inhibition by the small molecule smoothened inhibitor GDC-0449 in the bone forming prostate cancer xenograft MDA PCa 118b. *The Prostate*, 72 (15), 1638–1647.
- Karp, S.J., et al., 2000. Indian Hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via Parathyroid Hormone related-Protein-dependent and -independent pathways. *Development*, 127 (3), 543–548.
- Katagiri, S., *et al.*, 2013. Combination of Ponatinib with Hedgehog Antagonist Vismodegib for Therapy-Resistant BCR-ABL1-Positive Leukemia. *Clinical Cancer Research*, 19 (6), 1422–1432.
- Kawahara, T., et al., 2009. Cyclopamine an Quercetin Suppres the Growth of Leukemia and Lymphoma Cells. Anticancer Research (29), 4629–4632.
- Kiel, M.J., et al., 2005. SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell*, 121 (7), 1109–1121.
- Kiyoi, H. und Naoe, T., 2002. FLT3 in Human Hematologic Malignancies. *Leukemia & Lymphoma*, 43 (8), 1541–1547.
- Kobune, M., et al., 2009. Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells. *Cancer Science*, 100 (5), 948–955.

- Kopp, H.-G., et al., 2005. The Bone Marrow Vascular Niche: Home of HSC Differentiation and Mobilization. Physiology, 20 (5), 349–356.
- Krivtsov, A.V., et al., 2006. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL–AF9. *Nature*, 442 (7104), 818–822.
- Kubo, M., et al., 2004. Hedgehog Signaling Pathway is a New Therapeutic Target for Patients with Breast Cancer. Cancer Research, 64 (17), 6071–6074.
- Lagasse, E., et al., 2001. Toward Regenerative Medicine. Immunitiy, 14, 425–436.
- Lécuyer, E. and Hoang, T., 2004. SCL: From the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Experimental Hematology*, 32 (1), 11–24.
- Li, C., Chi, S. und Xie, J., 2011. Hedgehog signaling in skin cancers. *Cellular Signaling*, 23 (8), 1235– 1243.
- Liem, K.F., et al., 2009. Mouse Kif7/Costal2 is a cilia-associated protein that regulates Sonic hedgehog signaling. PNAS, 106 (32), 13377–13382.
- Li, L. und Xie, T., 2005. Stem Cell Niche : Structure and Function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.*, 21, 605–631.
- Loh, Y.-H., et al., 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics*, 38 (4), 431–440.
- Lord, B.I., Testa, N.G. und Hendry, J.H., 1975. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood*, 46 (1), 65–72.
- Löwenberg, B., Downing, J.R. und Burnett, A., 1999. Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 341 (14), 1051–1062.
- Magee, J.A., Piskounova, E. und Morrison, S.J., 2012. Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell*, 21 (3), 283–296.
- Makela, J.-A., et al., 2011. Hedgehog signalling promotes germ cell survival in the rat testis. *Reproduction*, 142 (5), 711–721.
- Mann, R.K. und Beachy, P.A., 2004. Novel Lipid Modifications of Secreted Protein Signals. Annual Review of Biochemistry, 73 (1), 891–923.
- Marigo, V. und Tabin, C.J., 1996. Regulation of Patched by Sonic hedgehog in the developing neural tube. *PNAS*, 93 (18), 9346–9351.
- Mazumdar, T., et al., 2011. Blocking Hedgehog Survival Signaling at the Level of the GLI Genes Induces DNA Damage and Extensive Cell Death in Human Colon Carcinoma Cells. Cancer Research, 71 (17), 5904–5914.
- McHale, C.M., Zhang, L. und Smith, M.T., 2012. Current understanding of the mechanism of benzeneinduced leukemia in humans: implications for risk assessment. *Carcinogenesis*, 33 (2), 240–252.
- Merchant, A., et al., 2010. Gli1 regulates the proliferation and differentiation of HSCs and myeloid progenitors. *Blood*, 115 (12), 2391–2396.
- Merchant, A.A. und Matsui, W., 2010. Targeting Hedgehog a Cancer Stem Cell Pathway. *Clinical Cancer Research*, 16 (12), 3130–3140.
- Moore, K.A. und Lemischka, I.R., 2006. Stem Cells and Their Niches. *Science*, 311 (5769), 1880– 1885.
- Muenke, M. und Beachy, P.A., 2000. Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10 (3), 262–269.
- Munchhof, M.J., et al., 2012. Discovery of PF-04449913, a Potent and Orally Bioavailable Inhibitor of Smoothened. ACS Medicinal Chemistry Letters, 3 (2), 106–111.
- Naujokat, C., 2012. Targeting Human Cancer Stem Cells with Monoclonal Antibodies. Journal of Clinical & Cellular Immunology, 01 (S5), 1–15.
- Nüsslein-Volhard, C. und Wieschaus, E., 1980. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. *Nature*, 287 (5785), 795–801.

- O'Donnell, M.R., et al., 2012. Acute Myeloid Leukemia. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 10 (8), 984–1021.
- O'Hara, W.A., et al., 2011. Desert hedgehog is a mammal-specific gene expressed during testicular and ovarian development in a marsupial. BMC Developmental Biology, 11 (72), 1–12.
- Okita, K., Ichisaka, T. und Yamanaka, S., 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448 (7151), 313–317.
- Oro, A.E., et al., 1997. Basal Cell Carcinomas in Mice Overexpressing Sonic Hedgehog. Science, 276 (5313), 817–821.
- Pabst, T., *et al.*, 2001. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-α (C/EBPα), in acute myeloid leukemia. *Nature Genetics*, 27 (3), 263–270.
- Pan, D., et al., 2012. Gli inhibitor GANT61 causes apoptosis in myeloid leukemia cells and acts in synergy with rapamycin. Leukemia Research, 36 (6), 742–748.
- Park, S.Y., Tong, M. und Jameson, J.L., 2007. Distinct Roles for Steroidogenic factor 1 and Desert hedgehog Pathways in Fetal and Adult Leydig Cell Development. *Endocrinology*, 148 (8), 3704– 3710.
- Pastorino, L., et al., 2009. Identification of a SUFU germline mutation in a family with Gorlin syndrome. American Journal of Medical Genetics Part A, 149 (7), 1539–1543.
- Porter, J.A., Young, K.E. und Beachy, P.A., 1996. Cholesterol Modification of Hedgehog Signaling Proteins in Animal Development. *Science*, 274 (5285), 255–259.
- Prasad, N.B., *et al.*, 2005. Gene Expression Profiles in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Reflect the Effects oh Hedgehog Signaling Pancreatic Ductal Epithelial Cells. *Cancer Research*, 65 (5), 1619–1626.
- Riobo, N.A. und Manning, D.R., 2007. Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochemical Journal*, 403 (3), 359–378.
- Robbins, D.J., Fei, D.L. und Riobo, N.A., 2012. The Hedgehog Signal Transduction Network. *Science Signaling*, 5 (246), 1–13.
- Rubin, L.L. und Sauvage, F.J. de, 2006. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5 (12), 1026–1033.
- Rudin, C.M., et al., 2009. Treatment of Medulloblastoma with Hedgehog Pathway Inhibitor GDC-0449. The New England Journal of Medicine, 361 (12), 1173–1178.
- Saito, Y., et al., 2010a. Identification of Therapeutic Targets for Quiescent, Chemotherapy-Resistant Human Leukemia Stem Cells. Science Translational Medicine, 2 (17), 1–11.
- Saito, Y., et al., 2010b. Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML. *Nature Biotechnology*, 28 (3), 275–281.
- Sales, K.M., Winslet, M.C. und Seifalian, A.M., 2007. Stem Cells and Cancer: An Overview. Stem Cell Reviews, 3 (4), 249–255.
- Sanchez, P., et al., 2004. Inhibition of prostate cancer prolideration by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. PNAS, 101 (34), 12561–12566.

Scadden, D.T., 2006. The stem-cell niche as an entity of action. Nature, 441 (7097), 1075–1079.

- Scales, S.J. und Sauvage, F.J. de, 2009. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30 (6), 303–312.
- Schaich, M., 2007. Akute myeloische Leukämien (AML). Leukämien. In: Facharzt Hämatologie Onkologie. Possinger, K. und Regierer, A.C. (Hrsg). 1. Auflage. Urban & Fisher in Elsevier, München, 343-347.
- Schairer, A., et al., 2010. Human Blast Crisis Leukemia Stem Cell Inhibition with a Novel Smoothened Antagonist. Abstract 1223. ASH Annual Meeting Abstracts. Washington. [Online im Internet]. URL: https://ash.confex.com/ash/2010/webprogram/Paper34265.html [Stand:17.12.2014].
- Schlenk, R.F., Döhner, K. und Döhner, H., 2013. Akute myeloische Leukämie: Genetische Diagnostik und molekulare Therapie. *Der Internist*, 54 (2), 171–178.
- Sekulic, A., et al., 2012. Efficacy and Safety of Vismodegib in Advanced Basal-Cell Carcinoma. The New England Journal of Medicine, 366 (23), 2171–2179.
- Stecca, B. und Ruiz i Altaba, A., 2010. Context-dependent Regulation of the GLI Code in Cancer by HEDGEHOG and Non-HEDGEHOG Signals. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2 (2), 84–95.
- St-Jacques, B., et al., 1998. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. Current Biology, 8 (19), 1058–1068.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. und Mc.Mahon, A.P., 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & Development*, 13 (16), 2072–2086.
- Su, Y.-C., et al., 2013. Resveratrol Downregulates Interleukin-6-Stimulated Sonic Hedgehog Signaling in Human Acute Myeloid Leukemia. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, eCAM, 2013, 547430.
- Takahashi, K. und Yamanaka, S., 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126 (4), 663–676.
- Tannishtha, R., et al., 2001. Stem cells, cancer and cancer stem cells. Nature, 414, 105–111.
- Trinh, T.N., et al., 2014. Hedgehog signalling pathway inhibitors as cancer suppressing agents. *MedChemComm*, 5 (2), 117.
- Trowbridge, J.J., Scott, M.P. und Bhatia, M., 2006. Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration. *PNAS*, 103 (38), 14134–14239.
- Tukachinsky, H., Lopez, L.V. und Salic, A., 2010. A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes. *The Journal of Cell Biology*, 191 (2), 415–428.
- Unden, A.B., *et al.*, 1996. Mutations in the Human Homologue of Drosophila patched (PTCH) in Basal Cell Carcinomas and the Gorlin Syndrome: Different in Vivo Mechanism of PTCH Inactivation. *Cancer Research*, 56 (20), 4562–4565.
- Vardiman, J.W., *et al.*, 2009. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114 (5), 937–951.
- Virchow, R., 1856. Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin: Weißes Blut. Verlag von Meidinger Sohn & Comp, Frankfurt am Main, 190-211.
- Wellbrock, J., Koehler, J.M. und Wagner, K., 2013. Expression Of Hedgehog Pathway Mediator Gli2 Represents a Clinically Negative Prognostic Marker In Acute Myeloid Leukemia and Its Inhibitor GANT61 Exerts Anti-Leukemic Effects In Vitro. Poster Abstract. ASH Annual Meeting Abstracts. Washington. [Online im Internet].

URL: https://ash.confex.com/ash/2013/webprogram/Paper61598.html [Stand: 17.12.2014].

- Xie, J., et al., 1998. Activating Smoothened mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*, 391 (6662), 90–92.
- Yauch, R.L., et al., 2008. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*, 455 (7211), 406–410.
- Yip, B.H. und So, C.W.E., 2013. Mixed lineage leukemia protein in normal and leukemic stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 238 (3), 315–323.
- Yoshimura, K. und Takeda, S., 2012. Hedgehog signaling regulates myelination in the peripheral nervous system through primary cilia. *Differentiation*, 83 (2), 78–85.
- Zbinden, M., et al., 2010. NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a crossfunctional network with GLI1 and p53. *The EMBO Journal*, 29 (15), 2659–2674.
- Zhang, J., et al., 2003. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425 (6960), 832–836.

- Zhang, J. und Li, L., 2008. Stem Cell Niche: Microenvironment and Beyond. *The Journal of Biological Chemistry*, 283 (15), 9499–9503.
- Zhao, C., et al., 2009. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature*, 458 (7239), 776–779.
- Zhao, Z., *et al.*, 2010. p53 loss promotes acute myeloid leukemia by enabling aberrant self-renewal. *Genes & Development*, 24 (13), 1389–1402.

## Danksagung

Auf dieser Seite möchte ich die Gelegenheit nutzen mich herzlich bei allen Personen zu bedanken, die auf ihre Art zu meiner Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Walter Fiedler für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie die Unterstützung danken, die er mir während der Zeit meiner Doktorarbeit stets entgegengebrachte.

Des Weiteren gilt mein Dank vor allem meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Jasmin Wellbrock auf deren Fachwissen sowie Beistand und auch Ermutigung ich immer zählen konnte. Ich erinnere mich gerne an die humorvolle und herzliche Zusammenarbeit unserer Arbeitsgruppe sowie auch an diverse private Zusammentreffen, die meine Doktorandenzeit auch persönlich geprägt haben.

An dieser Stelle möchte ich mich ebenfalls bei allen Mitarbeitern des Labors für ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Auch hier möchte ich nochmals die entspannte und freundliche Atmosphäre betonen, die mich während der Laborzeit meiner Doktorarbeit stets umgeben hat. Hervorheben möchte ich meine Kommilitonin Livia Fuhrmann, mit der ich sowohl die Laborzeit als auch einen Teil der Schreibphase verbracht habe und die mir zu einer guten Freundin geworden ist.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht haben und mich immer mit viel Liebe unterstützt haben. Dass sie mir Mut zugesprochen und vor allem immer an mich geglaubt haben. Ich danke auch meinem Bruder Veltin, der unendlich hilfsbereit ist und wesentlich an der Formatierung dieser Arbeit mitgewirkt hat. Auch meiner Schwester Franziska möchte ich dafür danken, dass sie so eine quirlige Person ist und mit ihrer unbeschwerten Art immer für mich da ist. Weiter danke ich Lavinia Becker, die für mich wie eine zweite Schwester ist und die Höhen und Tiefen meines Studiums und der Promotion hautnah miterlebt hat.

Großer Dank gilt auch meiner lieben Freundin Annette Lübbert, die ich an unserem ersten Tag an der Universität Hamburg kennenlernte und die mich mir ihren ausführlichen Korrekturen, aber auch Anregungen und Motivation im Schreiben der Doktorarbeit unterstützt hat und auf die ich während des Studiums und darüber hinaus immer zählen konnte.

Und nicht zuletzt danke ich meiner Freundin Janna-Lisa Velthaus, durch deren Empfehlung ich auf das Thema der Doktorarbeit aufmerksam wurde, mit der ich einige Abende im Labor verbracht habe und deren Freundschaft mir viel bedeutet.

## Lebenslauf

#### Persönliche Daten

| Name:         | Patrizia Seyfert |
|---------------|------------------|
| Geburtsdatum: | 19.06.1987       |
| Geburtsort:   | Worms            |

#### Akademische Laufbahn

| Seit 07/2010:    | Dissertation "Gezielte Smoothened-Inhibierung im Hedgehog-Signalweg<br>durch PF-04449913 in der akuten myeloischen Leukämie"<br>II. Medizinische Klinik und Poliklinik (Hämatologie und Onkologie)  |
|------------------|---|
| 04/2009-05/2013: | Medizinstudium an der Universität Hamburg<br>Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (05/2013)   |
| 09/2006-07/2008: | Medizinstudium an der Semmelweis Universität, Budapest, Ungarn<br>Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (07/2008)   |
| 10/2005-05/2006: | Vormedizinischer Kurs, McDaniel College Budapest, Ungarn  |
| 02/2012-01/2013: | Praktisches Jahr<br>Gynäkologie und Geburtshilfe, Neue Frauenklinik Luzern, Schweiz<br>Allgemein- und Viszeralchirurgie, Wexford General Hospital, Irland<br>Allgemein- und Viszeralchirurgie, Aklepios Klinik Barmbek, Hamburg<br>Innere Medizin, Universitätsklinikum Eppendorf Hamburg |
| 08/2009-12/2011: | Famulaturen<br>Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Grünstadt, Grünstadt<br>Onkologie, Marienkrankenhaus, Hamburg<br>Allgemeinmedizin, Allgemeinarztpraxis, Kaisersbach<br>Gynäkologie und Geburtshilfe, Agaplesion Diakonieklinikum, Hamburg   |
| Schulbildung     |   |
| 07/1997-06/2005: | Internationale Deutsche Schule Brüssel, Belgien<br>Abitur (06/2005)   |
| 09/1993-07/1997: | Deutsche Schule Antwerpen, Belgien  |
|                  |   |

### Berufserfahrung

| 11/2013-08/2014: Assistenzarztstelle, Medizinische Klinik, Krankenhaus St. Adolf-Stift, Rein | ıbek |
|--|------|
|--|------|

### Sprachkenntnisse

| Englisch:       | Sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift |
|-----------------|--|
| Französisch:    | Gute Kenntnisse in Wort und Schrift      |
| Niederländisch: | Grundkenntnisse in Wort und Schrift      |
| Latein:         | Kleines Latinum                          |

# Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....